

Doktori (PhD) értekezés

**Molekuláris markerek alkalmazása a szőlő magvatlanságának
követésére és *Rosa L.* taxonok rokonsági viszonyainak
vizsgálatára**

Deák Tamás

Témavezető:

Dr. Bisztray György Dénes, PhD
egyetemi docens, BCE SzBI Szőlészeti Tanszék

Külső konzulensek:

Dr. Facsar Géza, CSc
egyetemi docens, BCE KeTK Növénytani Tanszék

Dr. Kozma Pál, CSc
tudományos főmunkatárs, PTE TTK Szőlészeti és Borászati Intézet

Budapesti Corvinus Egyetem
Szőlészeti és Borászati Intézet
Szőlészeti Tanszék

Budapest
2010

A doktori iskola

megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok

vezetője: Dr. Tóth Magdolna
egyetemi tanár, DSc
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar,
Gyümölcstermő Növények Tanszék

Témavezető: Dr. Bisztray György Dénes
egyetemi docens, PhD
Budapesti Corvinus Egyetem, Szőlészeti és Borászati Intézet,
Szőlészeti Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, ezért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.

.....
az iskolavezető jóváhagyása

.....
a témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanács 2010. március 9-i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Kállay Miklós, CSc, BCE

Tagjai

Lukács Noémi, PhD, BCE

Hajdu Edit, CSc, BCE

Báló Borbála, PhD, SzBKI, Eger

Fári Miklós, DSc, DE

Opponensek

Kiss Erzsébet, CSc, SZIE

Kocsis László, PE, Georgikon

Titkár

Zanathy Gábor, CSc, BCE

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	7
2. Célkitűzés	9
3. Irodalmi áttekintés	11
3.1. Molekuláris markerek	11
3.1.1. Kémiai, fizikai és fehérje alapú molekuláris markerek	11
3.1.2. DNS alapú molekuláris markerek	12
3.1.3. AFLP adatok elemzése	16
3.2. Rózsa (<i>Rosa</i> L.)	19
3.2.1. A klasszikus rózsa rendszerek	20
3.2.2. Poliploidia a rózsa nemzetségben	23
3.2.3. Rózsák molekuláris markerezése	26
3.2.4. Rózsarendszerezés molekuláris alapokon	28
3.3. A szőlő (<i>Vitis vinifera</i> L.) magvatlansága	31
3.3.1. A szőlő magvatlanságának típusai	35
3.3.2. A szőlő-magvatlanság genetikai háttere	37
3.3.3. Szőlő-magvatlanság markerezése	40
3.3.4. A szőlő magvatlanságáért felelős génjelöltek	43
4. Anyag és módszer	45
4.1. A vizsgált növényanyag	45
4.1.1. A vizsgált rózsa taxonok	45
4.1.2. A szőlő-magvatlanság markerezése során felhasznált családok	48
4.2. Felhasznált módszerek	50
4.2.1. Mintagyűjtés és DNS kivonás	50
4.2.2. AFLP vizsgálat	51
4.2.3. AFPL adatok elemzése	53
4.2.4. Rózsa ITS fragmensek <i>CeII</i> polimorfizmusa	54
4.2.5. A szőlő-magvatlansághoz kapcsolt SCAR-CAPS marker	54
5. Eredmények	57
5.1. Rózsa fajok AFLP analízise	57
5.1.1. Filogenetikai megközelítés	65
5.2. <i>A Pimpinellifoliae</i> szekció <i>CeII</i> polimorfizmusa	67
5.3. Szőlő-magvatlanság követése SCAR-CAPS markerrel	69
5.3.1. SI és TII hibridcsaládok	69
5.3.2. VRH 3082-1-42 (BC ₄) × 'Kismis moldavszkij' család magvatlansága	71

5.4. Az SCC8 lókuszt jellemzése, markerfejlesztés	75
6. Eredmények megvitatása	81
6.1. Magyarországi rózsafajok AFLP vizsgálata	81
6.1.1. Előzetes megfontolások	81
6.1.2. AFLP vizsgálatok	83
6.1.3. A vizsgált rózsafajok taxonok rendszertani viszonyai	85
6.1.4. A <i>Pimpinellifoliae</i> szekció <i>CeII</i> polimorfizmusa	86
6.2. A szőlő-magvatlanság markerezése	87
6.2.1. Az SCC8 marker öröklődése a vizsgált családokban	87
6.2.2. Az SCC8 lókuszt jellemzése	90
6.2.3. MAS az SCC8 markerrel	92
6.2.4. A magvatlanság öröklődése a vizsgált nemzedékekben	93
6.2.5. <i>SdI</i> génjelöltek	95
6.3. Új tudományos eredmények	99
7. Összefoglalás	101
8. Irodalomjegyzék	103
9. Mellékletek	125
M1. A <i>Rosa genus</i> rendszertani felosztása	125
M2. Kiegészítő információk az Anyag és módszer fejezethez	128
M2.1. A vizsgált rózsafajok egyedek	128
M2.2. Általános oldatok, pufferek	131
M2.3. AFLP protokoll	132
M2.4. AFLP adatelemzés	135
M2.5. <i>CeII</i> protokoll	136
M2.6. Szőlő magvatlanság SCAR-RFLP protokoll	138
M3. Kiegészítések az AFLP eredményekhez	139
M3.1. Ordinációs diagramok	139
M3.2. Jaccard és Dice távolságon alapuló UPGMA dendrogramok	141
M4. Kiegészítő információk a szőlő magvatlanságának markerezéséhez	143
M4.1. Az SCC8 allélok többszörös illesztése	143
M4.2. Szőlő magvatlanságáért felelős génjelöltek	146

Ábrák jegyzéke

1.	Az AFLP reakció elve	13
2.	Bináris adatok kontingenciatáblája	17
3.	A rózsza nemzetség morfológiai sokfélesége	22
4.	A <i>Caninae</i> szekció mikrospóra-anyasejtjében lejátszódó meiotikus folyamatok vázlata	24
5.	A <i>Caninae</i> szekció makrospóra-anyasejtjében lejátszódó meiotikus folyamatok vázlata	26
6.	Sztenospermokarp 'Thompson Seedless' szőlőbogyó	36
7.	A sztenospermokarp magvatlanság öröklődésének modellje	38
8.	A <i>Caninae</i> szekciót képviselő egyes vizsgált egyedek	47
9.	SZ. NAGY LÁSZLÓ nemesítési programjából származó TII család pedigréje	49
10.	SZ. NAGY LÁSZLÓ nemesítési programjából származó SI család pedigréje	49
11.	IFJ. KOZMA PÁL multirezisztens, magvatlan csemegeszőlő nemesítési programjának általam vizsgált családja	50
12.	Az AFLP sávok gyakorisági eloszlása	57
13.	Ochiai különbözőségi mutatón alapuló NMDS	58
14.	Az AFLP adatok alapján végzett PCA	59
15.	A 40 Kárpát-medencei rózsza taxon rokonsági viszonyait mutató AFLP dendrogram	60
16.	A bootstrap elemzés konszenzus hálózata	62
17.	A <i>Rubigineae</i> alszekciót képviselő egyes vizsgált egyedek	64
18.	A vizsgált rózsza taxonok neighbor-net filogenetikai hálózata	65
19.	A vizsgált rózsza taxonok hibridizációs hálózata	66
20.	A <i>Pimpinellifoliae</i> szekció ITS polimorfizmusa	67
21.	A T II hibridcsalád egyedei genotípusának azonosítása SCAR-CAPS markerrel	69
22.	A pécsi SzBKI programjában leggyakrabban használt szülők SCC8 genotípusa	71
23.	A magvatlanság markerezése során tapasztalt gélmintázatok jellegzetes példái	72
24.	Az SCC8 lókuszt öröklődésének Punett-táblája	73
25.	A PN40024 klón genomról SCC8 primerekkel felszaporított lókuszt	75
26.	Ellenőrző emésztés a 'Kismis moldavszkij' SCC8 lókusztának klónjain	76
27.	Az SCC8 lókusztok NJ fája	76
28.	A szekvenált SCC8 allélok illesztésének egy részlete a magvassághoz kapcsolt Bg/II hasítóhely körül	77
29.	Az scc-F61 és scc-R850 primerekkel végzett amplifikáció és emésztés eredménye különböző magvas és magvatlan genotípusokon	78
30.	Szőlő-magvatlanság nyomonkövetése az scc-F6 és scc-R914 új SCC primerekkel	79

31.	Az új primerekkel felszaporított PCR-termék <i>Bgl</i> III, <i>Hind</i> III és <i>Pst</i> I emésztésének gélképe	79
32.	A magvatlanság különböző formái egy hasadó nemzedékben	94
33.	A szőlő konzervált miRC16 miRNS-ének másodlagos szerkezete	97
34.	Jaccard különbözőségi mutatón alapuló NMDS	139
35.	Dice-indexen alapuló NMDS	140
36.	A 40 Kárpát-medencei rózsza taxon rokonsági viszonyait Jaccard távolságok alapján bemutató dendrogram	141
37.	A 40 Kárpát-medencei rózsza taxon rokonsági viszonyait Dice indexek alapján bemutató dendrogram	142

Táblázatok jegyzéke

1.	Szőlőfajok felhasználása a nemesítésben	32
2.	A magvatlanság öröklődésével kapcsolatos feltételezések	37
3.	Az AFLP vizsgálatba bevont rózsza taxonok és azok ploidszintjei	46
4.	A <i>Pimpinellifoliae</i> szekció ITS-polimorfizmusának vizsgálatához felhasznált egyedek	48
5.	Az AFLP vizsgálatokhoz használt adapterek és primerek szekvenciái	52
6.	A <i>Pimpinellifoliae</i> szekció vizsgált egyedeinek <i>Ce</i> II polimorfizmusa	68
7.	Az SI és TII hibridcsaládok <i>SCC8</i> genotípusa és magvatlanság fenotípusa	70
8.	Hasadási arányok a BC ₄ × 'Kismis moldavszkij' nemzedékben	73
9.	Magvatlanság a BC ₄ × 'Kismis moldavszkij' családban	74
10.	Az <i>SCC8</i> lókuszra tervezett, a 4. és 19. kapcsoltsági csoportokat kizáró primerek szekvenciái.	77
11.	Kiegészítő információk a vizsgálatokba vont rózsza egyedekről	128
12.	A magvatlansághoz kapcsolt kromoszómaszakaszon található gének	146

Rövidítések jegyzéke

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism – amplifikált fragmenshossz polimorfizmus
ATP	adenozin-trifoszfát
BSA	Bulk Segregant Analysis – hasadó nemzedék csoportos elemzése
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequence – felszaporított szekvencia hasítási polimorfizmusa
cDNS	Copy DNA – RNS-ről másolt DNS
EST	Expressed Sequence Tag – kifejeződött szekvenciárészlet
ITS	Internal Transcribed Spacer – átírt köztes szekvenciák
MAS	Marker Assisted Selection – marker-támogatott szelekció
Mb	Megabase – megabázis
NMDS	Non Metric Multidimensional Scaling – nem metrikus többdimenziós skálázás
PCA	Principal Component Analysis – főkomponens analízis
PCR	Polymerase Chain Reaction – polimeráz láncreakció
QTL	Quantitative Trait Loci – mennyiségi tulajdonságok lókusai
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA – véletlenszerűen felszaporított DNS-polimorfizmus
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism – restrikciós fragmenshossz polimorfizmus
SCAR	Sequence Characterized Amplified Region – szekvencia-jellemzett amplifikált régió
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism – egyszál konformációs polimorfizmus
SSR	Simple Sequence Repeats – egyszerű szekvencia-ismétlődések
UPGMA	Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean – csoportátlag
VIGS	Virus Induced Gene Silencing – vírus-indukálta géncsendesítés
VIVC	Vitis International Variety Catalogue – Nemzetközi Szőlőfajta Katalógus
WPGMA	Weighted Pair Group Method with Averaging – egyszerű átlag

1. Bevezetés

A 20. sz. második felétől, a DNS szerkezetének és biológiai funkciójának felfedezésétől eltelt alig több mint 50 év alatt a DNS alapú vizsgálatok széles körben elterjedtek, mára már nem csak célzottan az adott témával foglalkozó kutatók mindennapjainak részei. A DNS alapú molekuláris markerezés témaköre széles területet ölel fel számos alkalmazási lehetőséggel, megközelítéssel, technikával.

A téma sokrétűsége ebben a dolgozatban is megjelenik, ahol különböző kérdésfelvetésekre – molekuláris taxonómia és egy fenotípusos tulajdonság markerezése – keressük a választ. A különböző jellegű kérdések más és más módszertani megközelítést igényelnek, ami az adatok kiértékelésének, értelmezésének sokszínűségét is maga után vonja. Ennek megfelelően a kérdéstől és az alkalmazott markerezési technikától függően az adatelemzési módszerek tárháza is rendkívül széles skálán mozog.

A molekuláris markerek több szinten szolgálhatnak értékes információval a növénynemesítő számára. A nemesítés során számításba vehető genotípusok – és általában egy adott növényfaj fajtái, fajtái – származásának és rokonsági kapcsolatainak tisztázása segíti a keresztezések megtervezését és az azt követő szelekciót. A keresztezések elvégzésével nem fejeződik be azonban a nemesítő munkája, sőt, ekkor kezdődik csak igazán. A szelekció összetett folyamatát a nemesítési programban egyes kiemelt hangsúllyal kezelt tulajdonságok molekuláris markerezése felgyorsíthatja, leegyszerűsítheti. Egyes esetekben – pl. a különböző eredetű rezisztenciagének piramidálása esetén – molekuláris markerekkel olyan genotípus szelekció is lehetővé válik, amelynek kivitelezése fenotípusos értékeléssel a gyakorlatban rendkívül időigényes és nehézkes.

Jelen dolgozat a markerezés két területét mutatja be. Az egyik a rokonsági kapcsolatok keresése rózsa fajok genetikai ujjlenyomatai alapján, a másik a szőlő egy célzott génjének, illetve tulajdonságának követése az ahhoz kapcsolt markerrel.

A rózsza nemzetség magyarországi diverzitása

A *Rosa* L. – és több más – nemzetség magyarországi nagy fajdiverzitása az ország földrajzi sajátosságaival magyarázható. A Kárpát-medencében három éghajlati tényező lép kölcsönhatásba

egymással, ezen introgresszív ütközési vonalakon a rózsa fajok gyakori interspecifikus hibridizációja komplex mintázatú változatosságot, valamint unikális fajokat eredményez (FACSAR, 2002).

A növényrendszertani kutatások legtömörebben azzal a mondással jellemezhetőek, amely szerint „ahol két taxonómus összeül, ott kialakul három vélemény”. Ez különösen érvényes az olyan összetett múltú nemzetségekre, mint amilyen a rózsa. A kiterjedt múltbéli és recens hibridizáció és az évszázadok óta érvényesülő jelentős antropogén hatás, továbbá a poliploidia széles skálájának jelenléte jelentősen befolyásolhatják a *genus* rendszertanát. A fajok változékonyak, könnyen kereszteződnek egymással, ami megnehezíti elkülönítésüket (FACSAR, 1993; WISSE-MANN, 2003; FACSAR, 2004; KERÉNYI-NAGY, 2006; KOOPMAN és mts., 2008). Éppen ezért egy rózsákra vonatkozó egységes rendszertan felépítése és a rózsák rendszertani besorolása igen nehézkes, azokban a helyileg pontos lokális flóraművek és a bizonytalan és a sok, máshol fajként kezelt taxont összevonó generális flóraművek ellentéte fejeződik ki. A morfológiai változatosság összetettsége miatt – beleértve a környezeti hatások által indukált eltéréseket is – a karakterek egyértelmű taxonómiai értelmezése gyakran nem egyszerű. Molekuláris markerek segítségével számos hátrány kiküszöbölhető. Kevés információval rendelkezünk ugyanakkor arról, mennyiben oldható fel a kiterjedt hibridizáció eredményeként létrejött genetikai mintázat AFLP markerekkel. Az introgresszív folyamatok markerekre gyakorolt hatásának megismerésével olyan metodikai együttes állítható fel, amely alkalmazható lehet pl. a ligeti szőlővel kapcsolatos aktuális kérdések (pl. létezik-e maga a faj?) megválaszolására is.

Magvatlanság nyomonkövetése szőlőnél (*Vitis vinifera* L.) SCAR-CAPS markerrel

A csemegeszőlő-nemesítésben alapvető igény a magvatlan genotípusok nemesítése, a világpiacon egy-két fajta kivételével kizárólag magvatlan csemegeszőlő kereskedelme folyik (SPIEGEL-ROY és mts., 1990; BOUQUET és DANGLLOT, 1996). Egy új fajta nemesítése során a magvatlanság csak egyike a kívánatos tulajdonságoknak, ezért a fajtának számos további követelménynek is meg kell felelnie, így kulcsfontosságú kérdés a megfelelően nagy egyedszámú utódnemzedék elérése. A hibridcsaládok egyedeinek azonban – a keresztezési kombinációtól függően – sokszor csak kis hányada magvatlan (ROYTCHEV, 1998), a magoncok felnevelése pedig a termőre fordulásig költséges. Ezért egy a magvatlanság magonc-kori jelzésére alkalmas molekuláris marker hatékony eszköz lehet a nemesítő kezében.

Bár a csemegeszőlő nemesítésben kívánatos sztenospermokarp magvatlanság genetikai háttere még nincs teljes mértékben tisztázva, az utóbbi években kialakult konszenzus alapján feltételezhető, hogy azt egy domináns inhibitor gén (*Sd1*) irányítja (BOUQUET és DANGLLOT, 1996), amelyhez kapcsolt markerek rendelkezésre állnak (LAHOUE és mts., 1998). Ezeket azonban minden szülőkombináció esetén tesztelni kell, meg kell vizsgálni, valóban alkalmas-e a marker a tulajdonság nyomonkövetésére az adott keresztezések utódnemzedékében.

2. Célkitűzés

A rózsza nemzetség egyes magyarországi képviselőinek AFLP vizsgálata

Az értekezés első részében arra keresem a választ, mennyiben alkalmazható az AFLP technika a *Rosa* nemzetség evolúcióját és jelenkori diverzitását meghatározó kiterjedt hibridizációs folyamatok vizsgálatára. Ennek megválaszolásához az alábbi célokat tűztem ki:

- Magyarország egyes rózsza taxonjai, taxoncsoportjai, ezek között számos hibrid rokonsági viszonyainak vizsgálatát AFLP markerekkel,
- azon adatelemzési módszerek megkeresése, amelyek képesek az adatszerkezet hibrid taxonokkal kapcsolatos információit feltárni.
- Az AFLP vizsgálatok kiegészítéseként célul tűztem ki továbbá a *Pimpinellifoliae* szekció ITS polimorfizmusának előzetes felmérését.

Szőlő-magvatlanság nyomonkövetése DNS alapú molekuláris markerrel

A dolgozat második részében a vizsgálatok célja a szőlő sztenospermokarp magvatlanságának kialakulásáért felelős *SdI* domináns inhibitor génhez kapcsolt marker öröklődésének, felhasználhatóságának vizsgálata, illetve az *SCC8* lókuszt jellemzése volt. Ehhez az alábbi célkitűzéseket állítottam fel:

- három hibridcsalád szülőpárjai *SCC8* genotípusának meghatározását,
- az irodalomban közölt, a magvatlansághoz kapcsolt *SCC8* SCAR-CAPS marker alkalmazhatóságának tesztelését a fenti családokban,
- az *SCC8* lókuszt molekuláris jellemzését, valamint annak lokalizálását a 'Pinot noir' genomon.
- Célul tűztem ki továbbá az *SCC8* marker esetleges továbbfejlesztését, finomítását.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Molekuláris markerek

Mind a genetikai kutatások, mind pedig a nemesítés során régóta használják a markerezés adta lehetőségeket. A markerek klasszikus értelemben morfológiai markerek, melyek a markergén által meghatározott fenotípus és a markerezni (követni) kívánt célgén által kialakított fenotípus közötti, a gének fizikai kapcsoltságán alapuló együttes öröklődésre építettek. Mivel azonban a fehérjét kódoló géneknek is csak kis hányada nyilvánul meg egyértelmű, könnyen követhető morfológiai tulajdonság formájában, ezeknek a markereknek az alkalmazhatósága korlátozott (BISZTRAY és VELICH, 1999).

A molekuláris markerek segítségével a genom jóval nagyobb részét használhatjuk markerként. A molekuláris markereknek egyik nagy előnye a morfológiai markerekhez képest, hogy közvetlen genotipizálást tesznek lehetővé, másik előnyük, hogy mivel a genomban ezek a markerek sűrűbben helyezkednek el, szorosabb kapcsoltságú markereket fejleszthetünk, növelve ezzel a markerezés hatékonyságát és megbízhatóságát.

3.1.1. Kémiai, fizikai és fehérje alapú molekuláris markerek

A kémiai és fizikai markerek valamely sejtalkotó(k) mennyiségi, minőségi különbségein alapulnak. Elvileg bármely kémiai összetevő használható markerként, a kihívás abban áll, hogy az adott kérdésnek megfelelő markert megtaláljuk. A kémiai markerek alkalmazásának egy speciális ága a kemotaxonómia (JENSEN, 2002; RÖSCH és mts., 2002; TRIANA és mts., 2010), amely az egyes taxonok kémiai összetétele alapján kísérli meg azok rendszerezését. A fizikai markerekre jó példa a közeli infravörös spektroszkópia, amelynek segítségével a vizsgált növény beltartalmi értékeinek nem destruktív meghatározása mellett fajták azonosítása, illetve vetőmagok hibriditásvizsgálata is végezhető (SEREGÉLY és mts., 2004; BISZTRAY és mts., 2006; KIM és mts., 2009).

A fehérje alapú markerezés két legelterjedtebb típusa a fehérjeprofil és az izonezimes vizsgálatok. Utóbbi során azt használjuk ki, hogy az egy adott enzimet kódoló gén egyes alléljai (változatai,

izoenzimjei) kapcsoltak lehetnek valamely általunk vizsgált tulajdonsághoz, így egy izoenzim jelenlétéből egy adott tulajdonságra következtethetünk (BARCELÓ és mts., 1996; YU és mts., 2001). Izoenzimek segítségével elkülöníthetők továbbá fajták (GRANGER és mts., 1993; GYÖRFFY-NÉ JAHNKE, 2006) és vizsgálhatók rendszertani viszonyok is: KIM és BYRNE (1996) rózsá taxonok hibrid eredetét igazolták izoenzimekkel.

3.1.2. DNS alapú molekuláris markerek

Bár egyes esetekben a fizikai és fehérje alapú markerek rendkívül jól alkalmazhatóak, napjainkban a DNS alapú markerek a legelterjedtebbek. A DNS alapú molekuláris markereket az alábbiakban nem annyira technikai jellegzetességeik (hasítás-felszaporítás), hanem elsősorban a potenciális felhasználásukat meghatározó genetikai információtartalmuk (domináns-kodomináns) alapján tekintem át.

Domináns markerek

Domináns markerek azok a DNS markerek, amelyekkel a marker szempontjából heterozigóta egyedek esetében kapott eredmények megegyeznek a domináns homozigótáéval.

RAPD ♦ A véletlenszerűen felszaporított DNS-polimorfizmus (RAPD, Random Amplified Polymorphic DNA, WELSH és MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS és mts., 1990) alapja egy olyan polimeráz láncreakció (PCR, Polymerase Chain Reaction), amelyben az indító szekvenciák rövidek (~10 nt). A folyamat véletlenszerűsége abban áll, hogy a primer-szekvenciákkal komplementer 10 nt hosszú bázissorrend véletlenszerűen is előfordulhat a genomban, így lehetővé téve az amplifikációt.

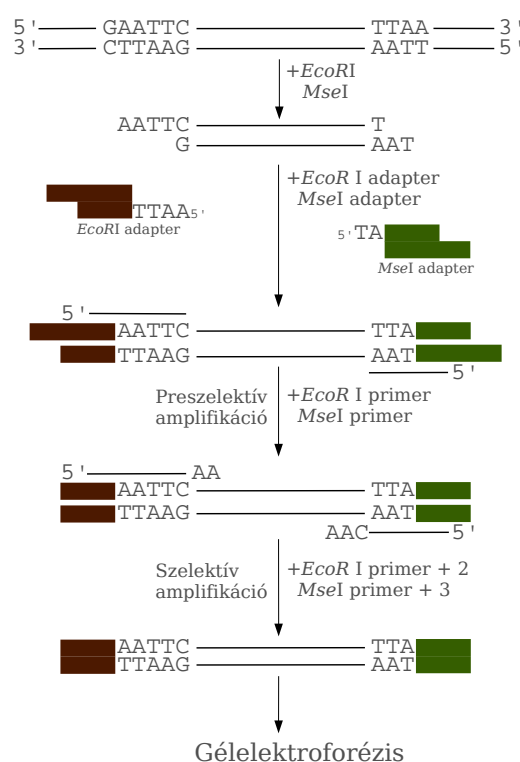
A módszer nagy előnye, hogy nincs hozzá szükség előzetes információra a vizsgált szervezet genomját illetően. Megkérdőjelezhető reprodukálhatósága miatt azonban mára nem szívesen alkalmazzák, holott nagyon gyors és egyszerű módszer arra, hogy elsődleges információt szerezzünk a vizsgált szervezetről. Domináns jellege miatt populációgenetikai vizsgálatokban használatát nem – vagy csak az alléleloszlásra vonatkozó bizonyos feltételek teljesülése esetén (KRAUSS, 2000) – javasolják, mivel a korszerű modellek általában haplotípusokkal dolgoznak (CSERGŐ és mts., 2009; EXCOFFIER és LISCHER, 2010). Kapcsolt markerek fejlesztése (ROCHE és mts., 1997; KUMAR és mts., 2009), illetve kapcsolsági térképek készítése során (BUDAHN és mts., 2009; TRINDADE és mts., 2009) a mai napig alkalmazott technika.

AFLP ♦ Az amplifikált fragmenshossz polimorfizmus (AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism, VOS és mts., 1995) technikát az alábbiakban részletesebben ismertetem (1. ábra), mivel dolgozatomban ezt a markertípust használtam a magyarországi rózsák rokonsági viszonyainak vizsgálatára (5.1. fejezet).

Az AFLP első lépése a genomi DNS hasítása két restrikciós endonukleáz enzimmal, általában egy ritkán vágóval – pl. 6 nukleotid hosszú felismerőhellyel, mint az *EcoRI* – és egy sűrűbben vágóval – pl. 4 nukleotid hosszú felismerőhellyel, mint az *MseI*. Ezek után az enzim által létrehozott ragadós végekhez kettősszálú DNS (dsDNS) adaptereket ligálunk, amely adapter szekvenciák specifikus PCR reakciót tesznek lehetővé anélkül, hogy a vágási hely környezetének DNS szekvenciáját ismernénk. A következő lépés az adapterekre, illetve a hasítóhely szekvenciájára tervezett indítószekvenciákkal végzett preszelektív amplifikáció. Mivel eukarióta genom esetében ez általában kiértékelhetetlen mennyiségű különböző fragmens felszaporítását jelenti, a következő lépés egy szelektív amplifikáció, amelynek során a PCR-ben használt primerek 3' végéhez 2–3, véletlenszerűen kiválasztott bázist adunk, ezáltal a fragmenseknek ekkor csupán töredéke (3–3 bázis esetén a két primeren csak mintegy 128-ad része) kerül felszaporításra. Ily módon már értékelhető mennyiségű fragmenst kapunk. A különböző méretű fragmenseket nagy elválasztóképességű elektroforézissel (poliakrilamid, kapilláris gélelektroforézis) választjuk el (MUELLER és WOLFENBARGER, 1999).

Az AFLP technika előnye, hogy egyenletes eloszlásban, a teljes genomot lefedve nagy mennyiségű információhoz jutunk a vizsgált szervezetet illetően. Éppen ezért összehasonlító vizsgálatokra kiemelten alkalmas, kapcsoltsági térképek készítése során előszeretettel használják (DEBENER és MATTIESCH, 1999; CRESPEL és mts., 2002; DOLIGÉZ és mts., 2002; LACAPE és mts., 2009).

Bár az AFLP-t itt a domináns markerek között sorolom fel, bizonyos alkalmazásokban kodomináns markerként is alkalmazható. Kapcsoltsági térképek készítése során – közel izogén vonalakat használva – a polimorfizmus mértéke kisebb, mint fajok vagy fajták összehasonlításakor, így egy sáv (azaz hasítóhely) elvesztésével párhuzamosan megjelenő új sávok azonosíthatók. Az AFLP



1. ábra: Az AFLP reakció vázlata (részletes magyarázat a szövegben). Az adapter- és primer-szekvenciákat reprezentáló vonalak a szemléltetést szolgálják, nem méretarányosak.

elektroforetogramok kvantitatív kiértékelésével szintén kodomináns markereket kapunk (JANSEN és mts., 2000).

Kodomináns markerek

RFLP ♦ Kronológiai sorrendben az egyik legelső DNS alapú markerezési technika a BOTSTEIN és mts. (1980) által kifejlesztett restrikciós fragmenshossz polimorfizmus (RFLP, Restriction Fragment Length Polymorphism), amely a DNS szekvencia-specifikus restrikciós endonukleázokkal történő hasítását, majd a vágási termékek méret szerinti elektroforetikus elválasztását jelenti, amit specifikus fragmensekkel történő hibridizálás (Southern blot, SOUTHERN, 1975) zár. Bár a markerezés hőskorában az RFLP-t rendszeresen használták akár tulajdonságok nyomonkövetésére (ROCHE és mts., 1997; MATSUMOTO és mts., 1998a), akár fajtaazonosításra (HUBBARD és mts., 1992; RAJAPAKSE és mts., 1992), a módszer önnmagában már ritkán kerül alkalmazásra. Ugyanakkor más technikákkal (pl. PCR) kombinálva ma is gyakran alkalmazott markerezési technika (pl. CAPS, Cleaved Amplified Polymorphic Sequence, felszaporított szekvencia hasítási polimorfizmusa) (YEAM és mts., 2005; ŘEPKOVÁ és mts., 2009).

SSR, mikroszatellitek ♦ A genomban található mikroszatellit régiók rövid nukleotid-szekvenciák tandem ismétlődéséből állnak (SSR, Simple Sequence Repeats), amely régióknak határszekvenciái faj – sokszor nemzetség – szinten konzerváltak, így azokra specifikus PCR primer tervezhető (QUELLER és mts., 1993). A mikroszatellit elnevezést a humán genomban azonosított rövid ismétlődő motívumokra LITT és LUTY (1989) alkalmazták először. Az *American Journal of Human Genetics* folyóirat azonos számában WEBER és MAY (1989) is javasolták az SSR szekvenciák PCR technikával történő felszaporítását polimorfizmus kimutatására. Növényekben CONDIT és HUBBELL (1991) azonosítottak először mikroszatellitek.

A specifikus primerekkel felszaporított fragmensek az esetek legnagyobb részében hossz-polimorfizmust mutatnak, amelyek segítségével megkülönböztethetők, azonosíthatók fajták (SEFC és mts., 1998; ESSELINK és mts., 2003; GALBÁCS és mts., 2009), azok származása (KISS és mts., 2009; VARGAS és mts., 2009), készíthetők kapcsoltsági térképek (LIEBHARDT és mts., 2003; YAN és mts., 2005; DOLIGEZ és mts., 2006), vizsgálhatók populációk (REISCH és mts., 2007; HÖHN és mts., 2009), illetve kapcsolt tulajdonságok (COSTANTINI és mts., 2008; ZHOU és mts., 2010). A fenti felsorolásból is látszik, hogy a technika rendkívül széles körben alkalmazható. A módszer előnye, hogy a genomban többé-kevésbé egyenletesen eloszló mikroszatellit lokuszok precíz kodomináns információval szolgálnak, ugyanakkor a markerfejlesztés és -alkalmazás meglehetősen költséges.

SCAR, *CAPS* ♦ A szekvencia-jellemzett amplifikált régió (Sequence Characterized Amplified Region) egyes tulajdonságok kialakulásáért felelős lókuszok markerezésére is használatos (LA-HOGUE és mts., 1998; GUO és mts., 2003; XU és mts., 2009). A módszer a vizsgált lókusz két alléljának nukleotidszekvenciája közötti különbségeken alapul, PCR alapú.

A specifikus primerekkel felszaporított fragmensek hossz-polimorfizmust, hasítási mintázatban (*SCAR-RFLP*, *CAPS*) különbséget mutatnak (MOURY és mts., 2000; WEILAND és YU, 2003), illetve igen-nem választ adnak, azaz az egyik allélról kapunk PCR-terméket, a másiktól nem (ebben az esetben a marker domináns jellegű). A technika specifikus, kodomináns, ugyanakkor minden markert külön kell fejleszteni, így átfogó vizsgálatokra kevésbé használható. Amennyiben rendelkezésre állnak ilyen markerek adott növényfajban, azokat a legtöbb kapcsoltsági térképezési munkában bevonják a vizsgálatokba (DOLIGÉZ és mts., 2002; WU és mts., 2004), ily módon a hozzá kapcsolt tulajdonság is lokalizálható a kapcsoltsági csoportokon.

Bázissorrend meghatározásán alapuló módszerek

Filogenetikai vizsgálatokban egyre elterjedtebben kerül alkalmazásra a nukleotid szekvenciákon alapuló markerezés. Az előzőekben felsorolt módszerekkel ellentétben ezekben az esetekben nem annyira a vizsgált objektumok közötti hasonlóságokat, az egyes tulajdonságokkal kapcsoltan öröklődő genom-részleteket, hanem az egyes kiemelt szakaszok alapján feltárható evolúciós történetet vizsgáljuk. A vizsgálandó szakaszokkal szembeni alapvető követelmények, hogy evolúciós, szelekciós nyomás ne torzítsa azok fejlődését, azaz egyes pontmutációk ne szelektálódjanak, ugyanakkor konzervált határolószekvenciákkal rendelkezzenek, amelyekre PCR primerek tervezhetők.

Az egyik legelterjedtebben használt ilyen szekvencia-csoportot a riboszómális RNS-t (rRNS-t) kódoló gének belső átírt szekvenciái képezik (ITS, Internal Transcribed Spacer, BALDWIN, 1992). A PCR segítségével felszaporított fragmensek szekvenálásával pontmutációk azonosíthatóak, az így kapott polimorfizmust elsősorban filogenetikai vizsgálatokban alkalmazzák (KIM és mts., 2004; GEHRKE és mts., 2008; TIPPERY és LES, 2008). A módszer hátránya, hogy rendkívül költséges, amennyiben a PCR-terméket klónozzuk és több klónt szekvenálunk. Bár egy genomban akár több ezer rRNS gén is található, ezek sajátossága, hogy egy irányba evolválódnak, nem tartják meg egyedi nukleotid-szekvenciájukat (ÁLVAREZ, 2003), így a módszer leegyszerűsíthető a termékek közvetlen szekvenálásával. Ugyanakkor egyes taxonok esetében a különböző rRNS gének nem homogenizálódnak (pl. rózsák esetében, WISSEMAN, 2002), így a PCR-termék közvetlen szekvenálása nem jelent megoldást.

A szekvenciákon alapuló alkalmazások másik nagy csoportja a DNS-vonalkód kifejlesztését célozza meg. Bár az állatoknál a módszer viszonylag egyszerűnek tűnik: egyetlen gén, a citokróm c

oxidáz 1 (*Co1*) rövid szekvenciájával megoldható a fajsztintű azonosítás (HEBERT és mts., 2005), a növények esetében a probléma összetettebb. A legtöbb szerző több gén és intergenikus vagy intron régió kombinációját javasolja (CHASE és mts., 2005; KRESS és mts., 2005). Egy, az utóbbi időben létrehozott konzorcium javaslatot tesz a növények DNS-vonalkódjának keret-rendszerére, amely javaslat szerint a fentieknek megfelelően az *rbcL* és *matK* plastid gének szekvenciái használandók a növényfajok azonosítására (HOLLINGSWORTH és mts., 2009).

Mivel a PCR termékek szekvenálása költséges eljárás, térképezési munkák során elterjedten használnak további módszereket a fragmensek közötti kisebb nagyobb eltérések kimutatására.

SSCP ♦ Az egyszál konformációs polimorfizmus (SSCP, Single Strand conformation Polymorphism) technika elve az, hogy egy adott DNS szakasz – általában PCR termék – egyszálú formájának másodlagos szerkezetét befolyásolja annak bázissorrendje, illetve az esetleges inzerciók, deléciók. Amennyiben két azonos hosszúságú DNS szakasz bázissorrendje különbözik, azok egyszálú DNS-ének másodlagos szerkezete is különbözni fog, ami elektroforetikus tulajdonságuk megváltozásához vezet. Az egyszálú DNS-fragmensek közötti eltéréseket nagy felbontású natív poliakrilamid gélelektroforézissel detektálhatjuk (ORITA és mts., 1989; SUNNUCKS és mts., 2000).

CeII ♦ Ha a kettősszálú DNS két láncának egymással szemben lévő bázisai között nem alakulnak ki hidrogénhíd-kötések, azt a *CeII* enzim képes felismerni és ott a DNS egyik szálát elhasítani (OLEYKOWSKI és mts., 1998; PIMKIN és mts., 2007). Bármely specifikus PCR reakció termékét vizsgálhatjuk *CeII* enzimmel polimorfizmus kimutatására. A módszert rutinszerűen alkalmazzák kapcsoltsági térképek készítésénél, illetve populációk genotípus-összetételének vizsgálatára (NIE-TO és mts., 2007). Ez utóbbi feladatra használható technika pl. az EcoTilling (GILCHRIST és mts., 2006; TILL és mts., 2006), a módszernek meghatározó eleme a *CeII* emésztés.

3.1.3. AFLP adatok elemzése

Az AFLP alapú markerezés eredményeként a kutató több száz lókusztól kap domináns információt, amelyek kiértékelésének módja alapvetően meghatározza a kapott eredmények értékelhetőségét, ezért külön kitérek az AFLP vizsgálatokból kapott adatok értékelésének szempontjaira, különös tekintettel az általam használt módszerek elveinek ismertetésére.

Csoportképzés bináris adatok alapján

Az olyan domináns markerek esetében, mint amilyen a RAPD és az AFLP, az első megközelítést általában az olyan módszerek jelentik, amelyek az eredményeket pusztán a sávok megléte, illetve

hiánya alapján értelmezik. A módszer hátránya – és egyben előnye is –, hogy ehhez a megközelítéshez nincsen szükség evolúciós modellre. Az ilyen módszerek két lépésben tárják fel az adatokban rejlő szerkezetet. Első lépésben a vizsgált objektumok (taxonok) között hasonlósági vagy távolsági mutatókat számolnak. (A hasonlósági mutatók a legtöbb esetben távolsággá alakíthatók a $d_{jk} = \sqrt{1 - s_{jk}}$ képlettel, ahol d_{jk} , illetve s_{jk} a j és k objektumok közötti távolságot, illetve hasonlóságot jelentik.) A vizsgált minták közötti páronkénti távolságok eredménye a távolságmátrix (PODANI, 1997).

Bináris adatok esetén a módszerek többségében a vizsgált objektumok között páronként meghatározásra kerül egy úgynevezett kontingenciátábla (2. ábra), a legelterjedtebb távolságmutatók ennek alapján számolnak (REIF és mts., 2005; BONIN és mts., 2007). Az egyezési koefficiens a legegyszerűbb hasonlósági mutató, amely azoknak a lókuszoknak az arányát adja meg, amelyek a két objektumban azonos információt hordoztak: $S_{SM} = \frac{a+d}{n}$ (a jelölések megfelelői a 2. ábrán találhatóak).

		2. objektum		
		1	0	
1. objektum	1	a	b	$a + b$
	0	c	d	$c + d$
		$a + c$	$b + d$	n

2. ábra: A bináris adatokra leírt hasonlósági, távolsági mutatók számításához használt kontingenciátábla.

Ez a távolság ugyanakkor egyenlő súlyozással veszi figyelembe az közös prezenciákat és abszenciákat, holott az AFLP adatok esetében jóval könnyebben vesznek el sávok (a restrikciós enzimektől és a szelektív primerektől függően ehhez 10–15 nukleotid valamelyikében elegendő egy pontmutáció), mint ahogy keletkeznek (ehhez egymástól megfelelő távolságban ki kell alakulnia a két hasítóhelynek, amelyeket a szelektív primerek túlnyúló nukleotidjai által meghatározott bázisoknak kell határolniuk) (KOOPMAN, 2005).

Éppen ezért az AFLP adatok értékelésénél előnyben részesítik azokat a módszereket, melyek a közös prezenciákat nagyobb súllyal veszik figyelembe, illetve figyelmen kívül hagyják a közös abszenciákat (KOOPMAN és GORT, 2004). A két leggyakrabban használt mutató a Jaccard és a Dice indexek. A Jaccard index egyszerűen figyelmen kívül hagyja a közös abszenciákat: $S_J = \frac{a}{a+b+c}$, míg a Dice – vagy Sorensen – index a közös abszenciák figyelembe kívül hagyása mellett kétszeresen súlyozza a közös prezenciákat: $S_D = \frac{2a}{2a+b+c}$, a súlyozásnak azonban az a következménye, hogy a Dice hasonlóság nem alakítható át euklidészi távolsággá. Szintén figyelmen kívül hagyja a közös abszenciákat az Ochiai koefficiens, amely a két objektumra mutató vektorok által bezárt szög kosinusa: $S_{OCH} = \frac{a}{\sqrt{(a+b)(a+c)}}$ (PODANI, 1997).

Az adatelemzés következő általános lépése a fenti módszerekkel kiszámított távolságok alapján történő hierarchikus osztályozás. Bár az osztályozásra számos módszer létezik, a legelterjedtebb módszerek a csoportátlag (UPGMA, Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) és

az egyszerű átlag (WPGMA, Weighted Pair Group Method with Averaging). Mindkét módszer agglomeratív, először a legközelebbi objektumokat vonják egy csoportba, majd a távolságmátrixot újraszámítva – immár eggyel kevesebb sorral illetve oszloppal – folyamatosan sorolják be az objektumokat csoportokba, végül egyetlen csoportot hozva létre. A két módszer közti különbség a csoportok közötti távolságok kiszámításában áll: az UPGMA módszer figyelembe veszi a csoportokban lévő objektumok számát, míg a WPGMA figyelmen kívül hagyja azt (PODANI, 1997).

Filogenetikai megközelítés

A fenti fenetikai elemzés előnye, hogy alkalmazásához nincsen szükség genetikai interpretációra, evolúciós modellre, csupán a markerek jelenléte, ill abszenciája alapján építi fel a csoportokat.

A parszimónia módszereknek alapelve az, hogy evolúciós szempontból az a fa tekinthető a legelfogadhatóbbnak, amelynek a rendelkezésre álló adatok alapján történő felépítésére a legkevesebb evolúciós lépésre van szükség. Ez a leginkább parszimón, azaz a legtakarékosabb fa. A szomszéd-összevonás módszere (neighbor-joining; SAITOU és NEI, 1987) az egyik legáltalánosabban használt evolúciós faépítési eljárás, ám nagy hátránya, hogy nem közvetlenül az adatokból számol, hanem a távolságmátrixból, ami információvesztéshez vezethet. A parszimónia módszerek ugyanakkor az eredeti adatmátrixból számolva nagy valószínűséggel megtalálják a legtakarékosabb – legkisebb össz-élhosszúságú – fát. Míg a Fitch-féle parszimónia (FITCH, 1971) lehetőséget ad több karakterállapotra (pl. a négyféle nukleotid), addig a Wagner-parszimónia (FARRIS, 1970) bináris vagy sorba rendezett adatokat igényel, a Dollo parszimónia (FARRIS, 1970) csak egy irányba engedi változni a tulajdonságokat, azonban egy karakterállapotnak csupán egyféle származtatását engedélyezi (PODANI, 1997).

Az AFLP adatok megjelenésének és elvesztésének egyenlőtlen esélye alapján a Dollo parszimónia tűnik alkalmasnak a kiértékelésre, ám KOOPMAN (2005) *Lactuca* fajokon végzett vizsgálata azt mutatja, hogy a módszer túl szigorú a megfelelő fa felépítéséhez, és rózsákon végzett metodikai tanulmányában KOOPMAN és mts. (2008) a Wagner-parszimóniát javasolják, mivel ez a bináris adatokra kifejezetten alkalmas, ugyanakkor nem köti ki, hogy egy karakterállapot csakis egyféleképpen jöhet létre.

A rendelkezésre álló szoftverek napjainkban a nukleotid-szekvenciákon alapuló evolúciós modellekre vannak kiélezve, legjobb esetben a FELSENSTEIN (1981) F81 elnevezésű restrikciós modelljét tartalmazzák. Ugyanakkor az utóbbi időben megjelent több olyan tanulmány (KOOPMAN és GORT, 2004; KOOPMAN, 2005; LUO és mts., 2007; LUO és LARGET, 2009), amely az AFLP markerek evolúciójával foglalkozik, így a jövőben remélhetőleg több lehetőség nyílik majd az AFLP alapú filogenetikai elemzésekre.

Az olyan komplex múltú – és jelenű – rendszerekben, mint amilyen a rózsa (3.2. fejezet), a parszimónia rendszerek lehetőségei korlátozottak mind a fa felépítése, mind pedig az eredmények ábrázolása terén. A hibridizáció ezekbe a modellekbe nem került ugyanis beépítésre, csakis egyféle leszármazási vonalat képesek szemléltetni. Erre a problémára a filogenetikai hálózatok szolgáltatják a megoldást. A filogenetikai hálózatok fogalma nincs teljes mértékben tisztázva (POSADA és CRANDALL, 2001; HUSON és BRYANT, 2006), a különböző szerzők nagyon eltérően kezelik a fogalmat. Filogenetikai hálózatok alatt általánosságban azokat a módszereket értjük, amelyek az evolúciót nem csupán az egyes markerek, illetve nukleotidok egyirányú változásaival és egymásra következő mutációival magyarázzák, hanem teret engednek a hibridizációs folyamatoknak, a leszármazási ágak összekapcsolódásának is. JOLY és BRUNEAU (2006) GAPDH szekvenciák elemzésével (3.2.4. fejezet) állítottak fel filogenetikai hálózatot rózsák esetében NeighborNet (BRYANT és MOULTON, 2004) módszerrel, ami a szomszéd-összevonás módszerének kifejezetten hálózatok felállítására módosított változata.

3.2. Rózsa (*Rosa* L.)

„*Species Rosarum difficile distingvuntur, difficilius determinantur; mihi videtur naturam miscuisse plures vel lusii ex uno plures formasse; hinc qui paucas vidit species facilius eas distinguit, quam qui plures examinavit.*”¹

(Carl von Linné, 1707–1778)

A vadrózsák az egész északi mérsékelt övben elterjedtek. Egyes kultúrába vont fajok a trópusi hegyvidékeken is megtalálhatók (Mexikóban, Etiópiában, Fülöp-szigeteken), a déli féltekén viszont teljesen hiányoznak, csak elvadulva fordulnak elő (pl. Argentína, Chile) (REHDER, 1940).

A rózsák lombhullató, esetenként örökzöld cserjék felálló, kúszó vagy elterülő, tüskés, ritkán tüskétlen hajtásrendszerrel. Levelei váltakozó állásúak páratlan számú levélkével, ritkán egyszerűek, párhásak. Virágai felállóak, a csészék és szirmok száma 5, ritkán 4, számos porzóval és termővel. A rózsa áltermése a vacokból fejlődő csipkebogyó, benne a csoportos aszmagtermésekkel (REHDER, 1940).

A *Rosa* nemzetséget magába foglaló *Rosaceae* család az APG III (BREMER és mts., 2009) rendszerezése szerint a virágos növények evolúciós törzsfáján a Valódi kétszikűek (*Eudicots*) Központi

¹ „A rózsák fajait nehéz megkülönböztetni, még nehezebb meghatározni; nekem úgy tűnik, a természet több fajt elegyített, vagy játékból egy fajból többet formált; ezért aki csak kevés fajt vizsgál, az könnyebben különbséget tesz köztük, mint az, aki többet megvizsgált” (LINNÉ, 1753, 492. o., Deák András fordítása).

helyzetű kétszikűek (*Core eudicots*) csoportjába, ezen belül a *Rosid* klád *Fabids* csoportjába, annak *Rosales* rendjébe tartozik (PODANI, 2007).

A Pallas Nagy Lexikonában FIALOWSKI (1897) a következőképpen vezeti be Rózsa szócikkét: „A R. számos fajtát a termőhely, éghajlat és időjárás okozta elváltozások, valamint a kölcsönös beporozódás miatt csak lassacskán ismerik meg. Bauhinus 36 egyszerű és teljes alakot, Lippai 15-öt sorol föl; Linné 10 fajt különböztet meg; Lindler 102-t; Wallroth 24 fajban 135 fajtát, Steudel 217 fajt ismert. Hooker mintegy 600 alakot 53 fajba soroz be. Azonban végleges megállapodás nem várható, mert az egymásba porozódás alakjai, melyeket leginkább himporevő legyek okoznak, a továbbszármazásban megtartják öröklött tulajdonságaikat, azaz szüleik egyikére vagy másikára nem vágnak vissza. És leginkább akkor állandósodnak, ha a magvat a csipkefaló madár messze elhurcolja. A sok alaknak összetartozását, csoportosítását többen kísérlették meg, de rendszerük csak ama kor ismereteinek tükrö. Reichenbach, Koch, Christ, De Candolle, Deséglise, Regel, Borbás és mások csoportjai a reá következő rendszeresítésben hol összefoglalás, hol szétoztás alá kerülnek. Még Crépin is, aki a brüsszeli növénykertben a R. alakjainak megismerésével 1879 óta kísérleteket végez, a saját maga föllállította montanae-csoportot a caninaevel egyesítette, ugyancsak a saját orientales-csoportját szétoztotta. Hogy a tüskés, molyhos növény szikkadt hazájából nyirkos vidékre hozva fegyverzetlenné, simává válik, azt éppen a Khinában tüskés Bankszia-R. példája mutatja, amely faj nyirkos levegőjű üvegházainkban tüskétlen. Ezért kell az egész föld növényzetét összehasonlítani.”

A rózsa nemzetség rendszertanának összetettségére vonatkozó fenti megállapítások legnagyobb része a mai napig megállja helyét. A növényrendszertan napjainkban átalakulóban van: a molekuláris, filogenetikai vizsgálatok hatására a virágos növények felsőbb szintű rendszertanában éppolyan „forradalmi” változások mennek végbe (BREMER és mts., 2003, 2009), mint a nemzetségeken belüli osztályozások területén. A következőekben megkísérlem áttekinteni a rózsák klasszikus – elsősorban morfológiai bélyegeken alapuló – rendszerét és az azt befolyásoló genetikai, szaporodásbiológiai sajátságokat, illetve kísérletet teszek a molekuláris vizsgálatok eddigi eredményeinek összefoglalására.

3.2.1. A klasszikus rózsa rendszerek

Mióta LINNAEUS 1735-ben megalkotta az első korszerű taxonómiai felosztást, a rózsafajok száma 12 és több száz között változott. A világon jelenleg REHDER (1940) átfogó felosztását tekintik irányadónak, amelyet legutóbb WISSEMAN (2003) vizsgált felül (M1. melléklet). Mindazonáltal a legtöbb rhodológus egyetért abban, hogy az utóbbi évtized(ek) molekuláris alapú filogenetikai vizsgálatai alapján szükség lenne a *genus* rendszertani újraértelmezésére egy korszerű rózsa monográfia keretében (WISSEMAN, 2003).

BORBÁS (1880) volt az első magyar botanikus, aki a Kárpát-medence rózsáit összeírta, köztük sok újat is, amelyeket monográfiába foglalt. A tanulmányban részletesen foglalkozik a *Rosa* nemzetség rendszerezésével. A fajokat 11 seregbe és 22 alseregbe osztotta. A csoportosítást tulajdonság-komplexek (tüskézettség, szőrözöttség, szírom stb.) alapján végezte korának meghatározó francia és belga rhodológusainak nyomán. Felosztása sok esetben ellentmondásos és mára túlhaladott.

A rózsá nemzetséget más taxonómusok négy alnemzetségre (*subgenus*) osztják: *Hulthemia*, *Hesperodos*, *Platyrhodon* és *Rosa*. A *Rosa subgenus* pedig további 10 csoportra (*sectio*) osztják (REHDER, 1940; ZIELIŃSKY, 1985, 1987; BERTOVIĆ, 1992; POPEK, 1996; WISSEMAN, 2003). Olyan egységes taxonómiai leírás azonban, amely minden rózsá taxont áttekinthetően és logikusan foglalna magába, máig nem áll rendelkezésre. A botanikusok dolgát tovább nehezíti a rózsánemzés terjesztő, keverő antropogén hatása (3. ábra).

Napjaink rózsá rendszerei mögött elsősorban morfológiai bélyegeken alapuló osztályozás áll. Ez a megközelítés – bár a gyakorló rhodológus általában könnyen alkalmazza – több problémát is felvet. A morfológiai bélyegekre ható szelekciós nyomás – például a környezeti feltételek gyors változása – egyrészt azonos bélyegek kialakulását eredményezheti evolúciósan egymástól távol álló fajok között (konvergencia), másrészt az adaptáció során jelentős morfológiai különbségek alakulhatnak ki közel-rokon fajok között (divergencia).

Az előbbire jó példát mutat a *Rubigineae* alszekció, amelyet szemcsés epikutikuláris viasz jelleméz, míg más alszekciókban a háromszög alakú viaszképződmények jellemzőek. Ugyanakkor egyes, a *Rubigineae* alszekción kívül álló, távoli rokon fajokon is kialakulhatnak szemcsés viaszképletek (WISSEMAN, 2000a). A morfológiai bélyegek szétválására jellemző példát mutat a *R. persica*, amelyet sajátos levélmorfológiája miatt egyes szerzők ki is emeltek a rózsá nemzetségből. Az utóbbi évek eredményei alapján azonban ez a taxon kétségtelenül a *Rosa* nemzetségbe tartozik (WU és mts., 2001a,b; RITZ és mts., 2005).

Magyarországon a *Rosa* (és sok más) nemzetség egyes fajainak nagyfokú diverzitása az ország három különböző klimatikus régiójának közös határain fellépő introgresszióval magyarázható. E területeken a gyakran fellépő interspecifikus hibridizációnak köszönhetően az egyes rózsafajok nagyfokú diverzitást mutatnak, és így számos képviselőjük egyedi és komplex genetikai háttérrel rendelkezik. Az újonnan létrejött hibrid-taxonok gyakran sokáig, évtizedekig is klonálisan megmaradhatnak (pl. *Rosa* × *reversa* W. et K. nm. *holikensis* [KMEŤ] SOÓ, *Rosa* × *spinulifolia* DEMATRA a Börzsöny hegységben; FACSAR, 1980; NAGY, 2007), így ezek megkülönböztetése szükséges.



(a) *R. myriacantha* (9; *Pimpinellifoliae* szekció) virágzás előtt



(b) *R. myriacantha* (9; *Pimpinellifoliae* szekció) generatív hajtása csipkebogyókkal



(c) *R. blanda* (21; *Cinnamomeae* szekció) virágzásban



(d) *R. blanda* (21; *Cinnamomeae* szekció) generatív hajtása



(e) *R. × francofurtana* F₁ (23; *Rosa* szekció) generatív hajtása virágzásban



(f) *R. gallica* (26; *Rosa* szekció) virágzás előtt

3. ábra: A rózsza nemzetség morfológiai sokfélesége. A szekció megnevezése előtt található mintagyűjtési számok alapján az adott egyedről további információ található a 3. és 11. táblázatokban. (Fotók: Udvardy László [b,c,d,e] és Deák Tamás [a,f])

3.2.2. Poliploidia a rózsa nemzetségben

Egyes becslések szerint a növényfajok kialakulásának mintegy 70 %-ában játszott szerepet a poliploidizáció (MASTERSON, 1994), a magasabb rendű növények genomszekvenciáinak egyre részletesebb megértésével azonban úgy tűnik, hogy a jelenség szinte minden növényfajunk kialakulását befolyásolta, befolyásolja (ADAMS és WENDEL, 2005; COMAI, 2005).

A fajképződésben betöltött szerepe mellett a poliploidia nagyban befolyásolhatja a későbbiekben leírt markerezési technikák sikerességét, illetve az adatok elemzését, értelmezését, ezért röviden kitérek a nemzetség ploidiaviszonyaira.

A rózsa nemzetség sokszínűsége a kromoszómaszámban is megnyilvánul. A rózsák alapkromoszómaszáma (x) 7, a különböző fajokban az eupoliploidia széles skálája megtalálható a diploid ($2n = 2x = 14$) taxonoktól egészen az oktoploid ($2n = 8x = 56$) típusokig (YOKOYA és mts., 2000). A nemzetségben viszonylag ritkán fordul elő aneuploidia (ROWLEY, 1960). Az interspecifikus és inter(szub)szekcionális hibridek a képet tovább színesítik, ráadásul számos olyan taxont ismerünk, ahol a ploid szint nem egységes. Ilyen taxonok például a *R. tomentosa* SM. ($2n = 4x, 5x, 6x = 28, 35, 42$), a *R. villosa* L. ($2n = 4x, 5x, 6x = 28, 35, 42$), a *R. agrestis* SAVI ($2n = 5x, 6x = 35, 42$), a *R. micrantha* BORRER ex SIM. ($2n = 4x, 5x, 6x = 28, 35, 42$), a *R. caesia* SM. ($2n = 5x, 6x = 35, 42$) (M1 melléklet). A többféle ploid szinttel jellemezhető fajok száma ugyanakkor nagyban függ a különböző szerzők eltérő fajfelfogásától is: egyes szerzők olyan – különböző ploid szintű – taxonokat is összevonnak egy fajba, amelyeket más szerzők külön fajként kezelnek WISSEMAN (2003).

A ploid szint rendszertani fontosságát mutatja, hogy a legtöbb korszerű rózsarendszer a szekciók, alszekciók bemutatásánál kitér a ploidia-szintre is (M1. melléklet). A rózsa nemzetségre jellemző ploidia-viszonyokat elsőként TÄCKHOLM (1922) dolgozta fel mintegy 300 egyedet megvizsgálva, a gyepűrózsák speciális meióziséra vonatkozó értékes megfigyelésekkel egészítve ki eredményeit. A kezdeti eredményeket DARLINGTON és WYLIE (1955) foglalta össze, JACOB és mts. (1996) mintegy 150 rózsa taxon ploid szintjét határozták meg flow citometriával, YOKOYA és mts. (2000) pontos adatokat szolgáltatnak a nemzetség fontosabb szekcióit képviselő kiemelt taxonok és egy-egy fajta DNS-mennyiségéről. Magyarországon elsősorban FACSAR GÉZA nevéhez fűződik az a számos tanulmány, amelyek a különböző taxonok ploid szintjét vizsgálják, és erre alapozva rendszertani, kultúrtörténeti következtetésekre jutnak (FACSAR és mts., 1989, 1991; MALECZKA és mts., 1990; POPEK és mts., 1991).

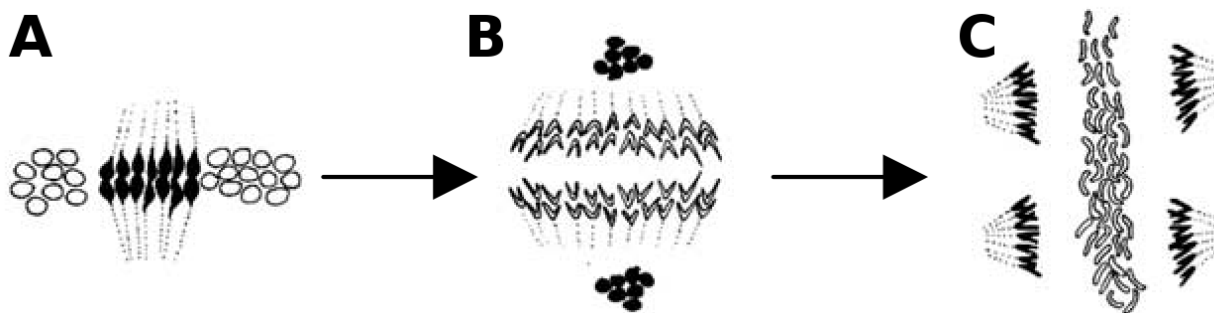
A különböző ploid szintű taxonok hibridizációjával létrejövő egyedek a szülők kromoszómaszámától függően páratlan kromoszómaszámúak is lehetnek. Az egyes rózsa taxonokra jellemző apomixis révén ezek az egyedek képesek lehetnek ugyan maggal terjedni (WERLEMARK, 2000), ám ez nem jár szülői tulajdonságok további kombinálódásával.

Páratlan kromoszómaszám megtartása ivaros úton

A rózsák egy csoportjában – a gyepűrózsákban (*Caninae* szekció) – kialakult egy kifinomult rendszer a páratlan kromoszómaszám ivaros úton történő fenntartására. A központi helyzetű *Caninae* szekcióra jellemző kiegyenlítetlen meiózis eredményeképpen a rózsa nemzetségben fertilis hibridek képződhetnek pl. pentaploid és tetraploid egyedek hibridizációjával is, ami a faj- és nemzetséghibridek számát nagyban növeli. A gyepűrózsák szekciójában tetraploid ($2n = 4x = 28$), pentaploid ($2n = 5x = 35$) és hexaploid ($2n = 6x = 42$) taxonokat egyaránt találunk, az ötszörös kromoszómaszerelvényt tartalmazó típusok a leggyakoribbak (WISSEMAN, 2003; M1. melléklet).

Az egyenlőtlen meiózis jelenségét TÄCKHOLM (1920) figyelte meg a *Caninae* szekcióban. A meiózis valamelyest eltérően játszódik le a mikrospóra és makrospóra anyasejtekben.

Egy pentaploid mikrospóra-anyasejt 35 kromoszómája közül mindössze 14 áll párba, így kialakul 7 bivalens. A fennmaradó 21 kromoszóma univalensként látható a sejtmagban a diakinézis során (4. ábra). A metafázis I-ben mind a bivalensek, mind pedig az univalensek a sejt központi síkjába rendeződnek. Anafázis I-ben először a bivalensek vándorolnak a sejt két pólusa felé, ezeket csak később követik az univalensek. TÄCKHOLM leírása szerint anafázis I-ben a kétkromatidás univalensek „kettéválnak” és ezek – a feltehetően egykromatidás kromoszómák – vándorolnak a sejt két pólusa felé. Ezt a jelenséget később LIM és mts. (2005) is igazolták.



4. ábra: A *Caninae* szekció mikrospóra-anyasejtjében lejátszódó meiotikus folyamatok vázlata. (A) Meiózis I. metafázis. A 7 bivalens (sötét színű kromoszómák) a sejt központi síkjának középső régiójában, az univalensek (világos színű kromoszómák) a központi sík peremi részén helyezkednek el. (B) Anafázis I. A bivalensek szétválnak, az univalensek kromatidái később követik azokat. (C) Anafázis II. A bivalensektől származó kétkromatidás kromoszómák kromatidái a sejtek pólusai felé vándorolnak, az egy kromatidás kromoszómák a központi síkban maradnak. A pollen sejtmagjai csupán a bivalensektől származó kromoszómákat tartalmazzák, haploidok ($n = x = 7$). (LIM és mts., 2005)

Meiózis II metafázisában az egy- és kétkromatidás kromoszómák egyaránt a sejt központi síkjába rendeződnek, bár azok elrendeződése már kevésbé szabályos. Gyakran előfordul, hogy a

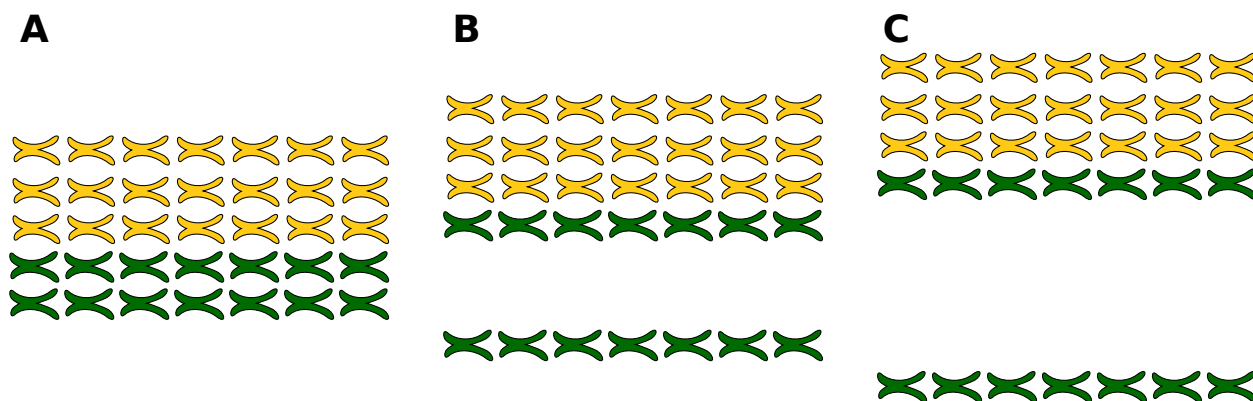
mikrospóra-anyasejtben kettőnél több – két nagy és több kisebb – osztódási orsó is kialakul attól függően, hogyan zajlott az univalensek szétosztása telofázis I-ben. Anafázis II-ben a bivalensek utódkromoszómái – anafázis I-hez hasonlóan – gyorsabban szétváltnak és elindulnak a pólusok felé, mint az univalensek utódkromoszómái. LIM és mts. (2005) leírása szerint az univalens kromoszómákból származó egy kromatidás kromoszómák – mivel azok szétválásra már nem képesek – anafázis II-ben a sejt központi síkjában maradnak.

Telofázis II után a mikrospóra-anyasejtben számos utódsejt jön létre – tetrádokról nem beszélhetünk –, amelyek száma, azok sejtmagjainak száma és a magokban található kromoszómaszám nagy variabilitást mutat. Nagy arányban fordultak elő olyan mikrospóra-anyasejtek amelyekben TÄCKHOLM négy nagyobb sejtet figyelt meg több kisebb mellett, feltételezése szerint ezek tartalmazták a bivalensekből származó 7–7 egykromatidás kromoszómát. A többi utódsejt általában kisebb, feltehetően véletlenszerűen tartalmazzák az univalensekből származó kromoszómákat. LIM és mts. (2005) igazolta, hogy ezek a kromoszómák nem vesznek részt a „tetrád” kialakításában, kis sejtmagok formájában vannak jelen a mikrospóra-anyasejtben.

A makrospóra-anyasejtek meiózisa (5. ábra) egyes elemeiben hasonlít illetve megegyezik, más elemeiben eltér a mikrosporogenezistől. Metafázis I. korai szakasza a mikrosporogenezissel megegyezően zajlik, ám annak kései szakaszában és anafázis I-ben jelentős eltérések mutatkoznak. A bivalensek a sejt ekvatoriális síkjába rendeződnek, de az univalensek ennek egyik oldalán halmozódnak fel a meiotikus orsón. A felhalmozódást a sejt polaritása határozza meg: az univalensek az esetek legnagyobb részében a csírapu felőli oldalon találhatóak. Anafázis I-ben a bivalensek szétváltnak, a csírapu felőli pólusra ezek utódai és az univalensek kerülnek, az ellentétes oldalra csupán a 7 bivalens egykromatidás utódai. A második meiotikus osztódás zavartalanul zajlik, az osztódás eredménye két nagyobb és két kisebb sejtmaggal – egyben magasabb és alacsonyabb kromoszómaszámmal – rendelkező sejt. Az embriózsák a magasabb ploid szintű, 28 kromoszómát tartalmazó sejtekből alakul ki.

A fent leírt mikrosporogenezis hatására a *Caninae* szekcióban a pollenminőség gyenge (WERLEMARK, 2000). Ugyanakkor ez a rendszer lehetővé teszi a gyepűrózsák számára, hogy ivaros úton fenntartsák akár a páratlan kromoszómaszerelvényszámot is. Fontos megjegyezni azonban, hogy ez a meiózis ploid szinttől függetlenül érvényes a *Caninae* szekcióra, a páros számú kromoszómaszerelvényt tartalmazó egyedek éppúgy csupán 7 bivalenst képeznek, csak az univalensek száma változik (tetraploid taxonoknál 7 bivalens és 14 univalens, hexaploidoknál 7 bivalens és 28 univalens alakul ki meiózis I-ben).

Az interspecifikus és inter(szub)szekcionális hibridek nagyarányú előfordulása mellett a fenti folyamat eredménye a szekcióra jellemző matroklín öröklődés (WERLEMARK és NYBOM, 2001; NYBOM és mts., 2006; WISSEMANN és mts., 2007), amely a morfológiai bélyegekre és a molekuláris markerekre egyaránt érvényes (WISSEMANN és RITZ, 2007).



5. ábra: A *Caninae* szekció makrospóra-anyasejtjében lejátszódó meiotikus folyamatok vázlata. (A) Meiózis I. metafázis. A 7 bivalens (sötét színű kromoszómák) a sejt központi síkjának középső régiójában, az univalensek (világos színű kromoszómák) a bivalensek mellett, a sejt csírákapu felőli pólusa felé rendeződnek az osztódási orsón. (B) Anafázis I. A bivalensek szétválnak, az összes univalens a sejt egyik oldalára vándorol. (C) Telofázis I. A bivalensektől származó két kromatidás kromoszómák és a szintén két kromatidás univalens kromoszómák az egyik utódsejtbe, a bivalensek másik fele a másik utódsejtbe kerül. (Meiózis II anafázisában a kromoszómák kromatidái válnak szét, az embriózsák tetraploid ($2n = 4x = 28$) sejtéből képződik). (RITZ, 2005 nyomán, módosítva)

3.2.3. Rózsák molekuláris markerezése

A rózsák első DNS alapú molekuláris markerezési munkáiban – a markerezési technikák fejlődésének megfelelően – elsőként az RFLP technikát használták. HUBBARD és mts. (1992) 6 olyan DNS-szakaszt klónoztak rózsából, amelyekkel az általuk vizsgált 8 fajtát el tudtak különíteni azok RFLP mintázata alapján, azonban 16 fajta elkülönítéséhez már 15 próbára volt szükség (RAJAPAKSE és mts., 1992). TORRES és mts. (1993) a RAPD módszert használták fajták elkülönítésére, nyolc oligonukleotiddal 5 fajtát különítettek el, míg MATSUMOTO és FUKUI (1996) három primerrel 5 fajta és 3 klón értékű genotípus között is különbséget tudott kimutatni a módszerrel. DEBENER és mts. (1996) 8 rózsaxon és 11 fajta ujjlenyomatát összehasonlítva arra a következtetésre jutottak, hogy a termesztett fajták variabilitása megközelíti a vad fajokét. EMADPOUR és mts. (2009) 15 rózsafajtán végzett RAPD elemzése szintén alátámasztja a fajták nagy RAPD-variabilitását annak ellenére, hogy a fajták többségét mindössze 7 fajra vezetik vissza (BRUNEAU és mts., 2007).

IWATA és mts. (2000) a damaszkuszi rózsaxon négy fajtájának származását kívánták felderíteni. Mivel a fajták között RAPD mintázatban nem találtak különbséget, ITS és *psbA-trnH* összekötő szekvenciákat vizsgáltak. Eredményeik alapján a magi ITS nagyobb variabilitást mutat, mint a kloroplasztisz *psbA-trnH* szekvenciák, ez utóbbi alapján azonosítani tudták azonban a damaszkuszi rózsaxon potenciális anyai szülőpartnerét.

DEBENER és mts. (2000) AFLP technikával hasonlítottak össze termesztett fajtákat és azok rügymutánsait. A fajták között sok eltérést tapasztaltak, míg a rügymutánsok között nem volt különbség. A legtöbb esetben ugyanakkor el tudták különíteni a rügymutánsokat az anyafajtától.

A fajtaazonosítás megkönnyítése céljából ESSELINK és mts. (2003) rózsza-specifikus mikroszatellit markereket fejlesztettek ki, amelyekkel sikeresen elkülönítették az 50 vizsgált teahibrid fajtát. A tanulmányba vont további 27 alanyfajta esetében az elkülönítés nem minden esetben volt sikeres, nyolc alanyfajta között nem sikerült különbséget detektálni a 24 mikroszatellit lókuszon. Ugyanakkor az alanyfajták között szerepelt 14 *R. canina* fajta is, melyek kiemelkedő mikroszatellit-polimorfizmust mutattak.

VOSMAN és mts. (2004) AFLP markereket használtak arra, hogy a rügymutációból nemesített fajtákat elkülönítsék a többi fajtától. 83 fajtát vizsgáltak, amelyek egy része 12 ismert mutáns-sorozatba tartozott. 284 polimorf AFLP lókusz alapján megállapították, hogy a rügymutánsok Jaccard-azonossága (PODANI, 1997) egymáshoz és a „szülő” fajtához képest minden esetben meghaladta a 0,95 értéket, míg a fajták közötti hasonlóság minden esetben 80 % alatt maradt.

BAYDAR és mts. (2004) szintén AFLP technikával igazolták a Törökországban termesztett *R. damascena* klónok közös eredetét: a mikroszatellit alapú vizsgálatokhoz hasonlóan (RUSANOV és mts., 2005) 996 lókuszon sem mutatkozott különbség a különböző árutermelő ültetvényekből begyűjtött damaszkuszi rózsák között. BABAEI és mts. (2007) ugyanakkor 9 mikroszatellit lókuszon bemutatták, hogy az iráni damaszkuszi rózsák ennél változatosabb genetikai háttérrel rendelkeznek.

A molekuláris alapú rendszertani vizsgálatok előrehaladtával – és a nemzetség pontosabb megértésével – párhuzamosan megindultak a rózsák populációit vizsgáló felmérések is.

JÜRGENS és mts. (2007) németországi és magyar gyepűrózsza-populációkat vizsgáltak RAPD markerekkel. A vizsgált *R. canina* populációkban viszonylag nagy mértékű genetikai változékonyságot detektáltak, míg egy adott terület populációi között a különbségek alacsonynak bizonyultak, ugyanakkor a földrajzi távolsággal párhuzamosan nőtt a populációk közötti genetikai távolság is. Azt az idegentermékenyülő fajokra jellemző jelenséget, mi szerint a populáción belüli heterozigotizáció nagyobb, mint a populációk közötti (NYBOM, 2004), szintén igazolták argentin *R. rubiginosa* populációk RAPD analízise alapján (AGUIRRE és mts., 2009).

Kapcsoltsági térképek

A fajtaazonosítás mellett a nemesítés számára az egyik legértékesebb információt a kapcsoltsági térképek adják (STAUB és mts., 1996). A *Rosa* nemzetségben DEBENER és MATTIESCH (1999) készítették el az első kapcsoltsági térképet. Szabad beporzásból származó féltestvér vonalak keresztezéséből kapott 60 F₁ egyeden végeztek térképezést RAPD és AFLP markerekkel, össze-

sen 127 markert helyeztek el a rózsák hét kapcsoltsági csoportján, miközben a teltvirágúsághoz (egyszerű vagy telt virág) és a szirmok színéhez (fehér vagy rózsaszín) kapcsolt markereket kerestek, ám ehhez nem bizonyult megfelelően nagyoknak a térkép felbontása. RAJAPAKSE és mts. (2001) rozsdá-ellenállóságra, növekedési erélyre, valamint a pálhák és a hajtás tüskézetlenségére hasadó 115 egyedből álló, diploid szülőktől származó F_2 utódnemzedéket felhasználva készítettek kapcsoltsági térképet mintegy 350 AFLP marker, 21 *Rosaceae* SSR lókuszt és izoenzim-mintázatot alapján. (CRESPEL és mts., 2002) egy dihaploid tearózsza-hibrid és *R. wichuraiana* keresztezéséből származó 91 tagú diploid utódpopuláció felhasználásával helyezték el a szülők kapcsoltsági térképén 68, illetve 108 AFLP markert. A térképre a tüskék számát, a folytonos virágzást és a teltvirágúságot meghatározó QTL-eket (Quantitative Trait Loci – mennyiségi tulajdonságok lókusztai) helyezték el. DUGO és mts. (2005) egy diploid teahibrid fajta és a *R. wichuraiana* keresztezéséből származó 96 F_1 -ből álló térképező populáció alapján készítettek kapcsoltsági térképet, amire 7 izoenzim, 169 RAPD és 10 mikroszatellit markert helyeztek el. A térképező populáció alapján a virágmérethez, a virágzás kezdetéhez, a levélmérethez és lisztharmat rezisztenciához kapcsolt QTL-eket azonosítottak.

Az eddig elkészült legnagyobb felbontású térképet YAN és mts. (2005) készítették 88 egyedes F_1 térképező populáción. A kapcsoltsági térkép elkészítéséhez 320 AFLP és 74 mikroszatellit markert használtak fel. A betegség-ellenállóság térképezéséhez kibővítették a használt markereket protein kináz motívumok és rezisztencia génanalógok (RGA-k) szekvenciáival. Az elkészült térkép alapján megkezdődhetett a markerfejlesztés a betegség-ellenállóságra történő nemesítés számára. ZHANG és mts. (2006) további mikroszatellit markereket azonosított rózsákban, amelyekkel két korábban elkészített – elsősorban AFLP markereken alapuló – térképet (CRESPEL és mts., 2002; DUGO és mts., 2005) egyesítve és kiegészítve állított fel térképet.

3.2.4. Rózsarendszerezés molekuláris alapokon

A nemzetség rendszertanának összetettségének köszönhetően a fajta-elkülönítés és -azonosítás mellett viszonylag korán megkezdődtek a molekuláris markereken alapuló rendszertani, filogenetikai vizsgálatok is. MILLAN és mts. (1996) Spanyolországban gyűjtött négy rózsafaj – mindegyik a *Caninae* szekció tagja – összesen 17 egyedet vizsgáltak, a fajok közötti eltéréseket és a fajon belüli hasonlóságokat 10 RAPD primer segítségével igazolni tudták. WU és mts. (2001a) 9 RAPD primer felhasználásával 200 informatív markert kaptak, ezek segítségével kívánták tisztázni a *Synstylae* szekció filogenetikai viszonyait, eredményeik alapján már bizonyos rendszertani átértékelésre is javaslatot tettek (pl. a *R. multiflora* var. *adenochaeta* változat faj szintre emelésére).

Míg a nagy hibridizációs gyakoriság, a számos faj és kistaj előfordulása, a változatos morfológiai tulajdonságok, továbbá a fenti RAPD eredmények a nemzetség nagy genetikai változékonyságra

utaltak, a extranukleáris DNS-en alapuló markerezési munkák hamar rámutattak, hogy a fajok közötti szekvencia-variabilitás a vártnál alacsonyabb. MATSUMOTO és mts. (1997) mintegy 15 taxonon és négy kertészeti formán végeztek RFLP vizsgálatokat sejtorganelumból származó próbákkal, azonban még a szekciók között sem tapasztaltak számottevő különbséget. MATSUMOTO és mts. (1998b) ezután plasztisz eredetű *matK* szekvenciák alapján igazolták a rózsa klasszikus rendszertani csoportjait, ám az általuk tapasztalt variabilitás – az RFLP adatok alapján vártaknak megfelelően – kicsi, a vizsgált 1518 nukleotid-pozíció közül csupán 106-ban (7 %) találtak báziscserét. WU és mts. (2001b) 30 rózsa taxon magi ITS-szekvenciáinak összehasonlításával megkérdőjelezték a *Rosa* és a *Platyrrhodon* alnemzetségek elkülönülését, ugyanakkor meg kell jegyeznünk, hogy a szerzők a *Rosa* alnemzetségnek csupán ázsiai képviselőit vonták be a vizsgálatba.

A kezdeti tapogatózások után megkezdődtek a nagyobb faj- és mintaszámot vizsgáló munkák. JAN és mts. (1999) 36 rózsa taxonhoz sorolt 119 genotípus összehasonlító elemzését végezték el 213 RAPD marker alapján. A nagy mintaszám ellenére kimaradt az összehasonlításból a *Caninae* szekció, a tanulmányba igyekeztek diploid típusokat összeválogatni. WU és mts. (2000) *matK* szekvenciák alapján mérték fel Japán rózsafajait, és – bár a variabilitás a korábbiaknál is alacsonyabb (4,7 %) volt és a *Pimpinellifoliae* szekció, valamint a *Rosa* szubgenusz polifiletikusnak bizonyultak – arra a következtetésre jutottak, hogy a *matK* szekvencia alkalmas a *genus* rendszertani viszonyainak tisztázására.

A *Caninae* meiózis markerek öröklődésére gyakorolt sajátos hatásait mikroszatellit markerekkel vizsgálva NYBOM és mts. (2004) megállapították, hogy a módszer nagyfokú polimorfizmust mutat a rózsáknál, így alkalmas lehet a nemzetség rendszertanának felülvizsgálatára. A korábban fajtaazonosításra kifejlesztett mikroszatellit markerek (ESSELINK és mts., 2003) segítségével ESSELINK és mts. (2004) olyan technikát dolgoztak ki (MAC-PR, Microsatellite DNA allele counting – peak ratios; mikroszatellit allélszámmeghatározás csúcsintenzitás-arányokkal), amellyel hatékonyan és gyorsan meg tudták határozni a vizsgált taxonok ploidszintjét. Az új technika null-allélok azonosítására is alkalmasnak bizonyult. A módszer széles körű elterjedését némileg hátráltatja, hogy megbízható alkalmazásához rendkívül könnyen értékelhető, a markertípusra jellemző dadogást („stutter band”-eket) nélkülöző mikroszatellit lokuszokra van szükség.

ATIENZA és mts. (2005) 109 rózsa taxon rokonsági viszonyait elemezték mintegy 45 RAPD marker alapján. A korábbi munkáktól eltérően a tanulmányba bevontak számos intra- és interszekcionális hibridet is. A szerzők – amellett, hogy számos, a fentiekben leírt rendszertani változtatás szükségességét megerősítették – megállapították, hogy a számos hibrid bevonásával a *Caninae* szekció alszekciói között a határok elmosódnak, azok nem igazolhatóak. A szerzők megerősítik a feltételezést (ZIELIŃSKY, 1985; RITZ és mts., 2005), miszerint a rózsa nemzetség – ezen belül

is különösen a *Caninae* szekció – fiatal nemzetség, amelyben a fajképződés folyamata jelenleg is folyamatban van.

RITZ és mts. (2005) a poliploid gyepűrózsák eredetét keresve 66 rózsa taxon magi ITS (nrITS) szekvenciáját és az ITS szakaszok prediktált másodlagos szerkezetét vizsgálták. Ebben a tanulmányban már kiemelt figyelmet szenteltek a *Caninae* szekciónak, ugyanakkor igyekeztek a teljes nemzetséget „lefedni”. Mivel a rózsák nrITS szakaszai nem hajlamosak az összetartó evolúcióra (WISSEMAN, 2000b; KOVARIK és mts., 2008), a különböző eredetű ITS szakaszok szekvenciája közötti különbségek nem mosódnak el. Vizsgálataik megerősítették a korábbi feltételezést (ZIELIŃSKY, 1985; NYBOM és mts., 2006), amely szerint a többszörös allopoliploid *Caninae* szekció egy mára kihalt protocanina – feltehetően ebben alakulhatott ki a sajátos *Caninae* meiózis – és a gyepűrózsákon kívüli különböző szekciók hibridizációjával jött létre. Adataikat kloroplaszt *atpB-rbcL* szekvenciákkal kiegészítve megállapították, hogy a *Rosa* genus számos klasszikus rendszertani csoportja polifiletikus, az alnemzetségek molekuláris adatok alapján nem támogatottak, a legmagasabb nemzetség alatti rendszertani kategóriának a szekciót javasolják (WISSEMAN és RITZ, 2005). Több szekció (*Cinnamomeae*, *Carolinae* és *Pimpinellifoliae*) polifiletikusnak bizonyult, egyes alnemzetségek (*Platyrhodon*, *Hesperhodos*) valamint a *Rosa* alnemzetség szekciói (*Laevigatae* és *Bracteatae*) a *Pimpinellifoliae* szekcióba tagozódtak be. A fenti eredmények alapján WISSEMAN és RITZ (2005) konkrét javaslatot tettek a *Rosa* nemzetség rendszertanának revíziójára.

BRUNEAU és mts. (2007) a *Rosa* nemzetség összes taxonómiai egységét lefedő mintakészleten végeztek filogenetikai vizsgálatot *trnL-F* *psbA-trnH* régiók szekvenciái alapján. Bár a vizsgálatban kiemelt hangsúlyt fektettek az észak-amerikai fajokra – ezeket a korábbi tanulmányok csak érintőlegesen vizsgálták –, a *Rosa* alnemzetség is megkülönböztetett figyelmet kapott. Eredményeik alapján az alnemzetség két fő csoportra osztható: az egyikben a *Carolinae*, *Cinnamomeae* és *Pimpinellifoliae* szekciókba sorolt taxonok tartoznak, a másikba az alnemzetség többi szekciója (*Banksianae*, *Bracteatae*, *Caninae*, *Indicae*, *Laevigatae*, *Rosa*, *Synstylae*), és a *Pimpinellifoliae* egyes taxonjai. Ugyanez a csoport aléllvariánsok alapján meghatározott haplotípusok alapján vizsgálta az észak-amerikai rózsa taxonok rokonsági viszonyait (JOLY és BRUNEAU, 2006; JOLY és mts., 2006). Az allélvariánsokat a gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH), trióz foszfát izomeráz (TPI) és malát szintáz (MS) gének kódoló és nem kódoló szekvenciái alapján határozták meg. Bár a módszer eredményeik alapján ígéretes, azokat szélesebb genetikai anyagon még nem tesztelték.

(KOOPMAN és mts., 2008) 46 rózsa taxon összesen 92 egyedet vizsgáltak AFLP markerekkel arra keresvén a választ, alkalmas-e a módszer az összetett rendszertani viszonyokkal jellemzett *Rosa* nemzetség vizsgálatára. A tanulmányban kiemelt hangsúlyt fektettek az ideális adatelemzési módszer meghatározására. Eredményeik alátámasztják WISSEMAN és RITZ (2005) javaslatát,

amely szerint a *Platyrhodon* alnemzetséget a *Rosa* alnemzetségbe kell besorolni, nem tartják továbbá indokoltnak a *Hulthemia* alnemzetség kiemelését sem. A *Carolinae* szekciót a *Cinnamomeae* szekcióba sorolnák be, a *Caninae* szekciót monofiletikusnak találták, amin belül a *Rubigineae* alszekció szintén monofiletikusnak bizonyult. A *Caninae* szekción belül WISSEMANN és RITZ (2005) javaslatával összhangban KOOPMAN és mts. (2008) sem tartják ugyanakkor indokoltnak a további alszekciók elkülönítését.

Belgium *Caninae* szekcióba tartozó rózsáinak populációin végeztek részletes morfológiai és AFLP vizsgálatokat DE COCK és mts. (2008). Eredményeik megerősítették, hogy a szekción belül a *Rubigineae* alszekció a legjobban elhatárolódott csoport. A *Rubigineae* alszekció kizárása után a korábbi eredményekkel szemben (RITZ és mts., 2005; KOOPMAN és mts., 2008) a szerzők igazolva látják a *Vestitae* alszekció elkülönítését a *Tomentellae* és *Caninae* alszekcióktól, ugyanakkor ez utóbbi két csoport elkülönítése továbbra sem indokolt az AFLP-adatok alapján.

3.3. A szőlő (*Vitis vinifera* L.) magvatlansága

A *Vitis* nemzetséget magába foglaló *Vitaceae* család az APG III (BREMER és mts., 2009) rendszerezése szerint a virágos növények evolúciós törzsfáján a Valódi kétszikűek (*Eudicots*) Központi helyzetű kétszikűek (*Core eudicots*) csoportjába, ezen belül a *Rosid* klád *Vitales* rendjébe tartozik. Az APG III rendszere szerint a rend izolált, alapi helyzete a *Rosid* kládon belül és az, hogy a *Fabids* és *Malvids* kládoknak testvérkládja, jelenleg elfogadható ugyan, de ennek támogatottsága viszonylag alacsony (WANG és mts., 2009).

A szőlő az emberiség legrégebben termesztett kultúrnövényei közé tartozik. A kerti szőlőt (*Vitis vinifera* L.) a legtöbb szerző a ligeti szőlőtől (*Vitis vinifera* L. subsp. *sylvestris* [C.C.GMEL.] HEGI syn. *Vitis sylvestris* C.C.GMEL.) származtatja. Az utolsó jégkorszakot követően a *V. sylvestris* elterjedt egész Európában. A szőlő termesztésbe vonása a mai Törökország, Örményország és Irán területén, Kr.e. 6000 körül kezdődhetett (BÉNYEI és mts., 1999). A szőlőtermesztés és a szőlő, továbbá a belőle készített bor szorosan kapcsolódik a mezőgazdaság, a kereskedelem fejlődéséhez, meghatározó eleme volt – és a mai napig az is maradt – az emberi kultúra fejlődésének. Az antik kultúrák isteneket rendeltek a borhoz (Dionüszosz illetve Bacchus), a mediterráneum ősi kultúrái szerint a bor az istenekkel harcoló férfiak véréből ered (MCGOVERN, 2004). A szőlőből készült borra egész gazdaságok és közösségek épültek (OLMO, 1976).

A világon évente mintegy 67,7 millió tonna szőlőt termesztenek, az alma és a banán után a szőlő a harmadik legnagyobb mennyiségben termesztett gyümölcs.² A világ szőlőtermésének mintegy 12 %-ka kerül felhasználásra csemegeszőlőként (BÉNYEI és mts., 1999).

² 2008, <http://faostat.fao.org/>

1. táblázat: Különböző szőlőfajok felhasználásának aránya a 20. sz.-i szőlőnemesítésben. (THIS és mts., 2006 nyomán, módosítva)

Faj	Felhasználás új fajta nemesítésére	Felhasználás alanyfajta nemesítésére	Felhasználás interspecifikus keresztezőkben
<i>Vitis rotundifolia</i> MICHX.	++	+	+
<i>Vitis aestivalis</i> MICHX.	–	–	++
<i>Vitis amurensis</i> RUPR.	+	–	++
<i>Vitis cinerea</i> (ENGELM.) ENGELM. ex MILLARDET var. <i>helleri</i> (L.H. BAILEY) M.O. MOORE	+	+++	–
<i>Vitis mustangensis</i> BUCKLEY	–	+	–
<i>Vitis tiliifolia</i> HUMB. & BONPL. ex SCHULT.	–	–	+
<i>Vitis</i> × <i>champinii</i> PLANCH.	+	+	–
<i>Vitis cinerea</i> (ENGELM.) ENGELM. ex MILLARDET	–	+	++
<i>Vitis cordifolia</i> LAM.	–	+	+
<i>Vitis labrusca</i> L.	+++	++	+++
<i>Vitis acerifolia</i> RAF.	+	++	–
<i>Vitis vulpina</i> L.	++	+++	+++
<i>Vitis rupestris</i> SCHEELE	++	+++	+++
<i>Vitis cinerea</i> (ENGELM.) ENGELM. ex MILLARDET var. <i>floriana</i> MUNSON	–	+	–
<i>Vitis vinifera</i>	+++++	+	++++

A generatív szaporításnak, a szőlőmagok szállításának nagy jelentősége lehetett a szőlő domesztikációjának kezdetén és az új szőlőtermő vidékek kialakulása során (THIS és mts., 2006). Az egyes bortermő vidékeken bizonyított „fajtákat” ezután vegetatív úton szaporították, amíg az 1860-as években az Észak-Amerikából érkező filoxéra megtizedelte Európa szőlőültetvényeit. A kártevő minden eurázsiai szőlőfajta gyökerét megtámadja, és egy-két éven belül a tőke pusztulását okozza. Tartós megoldást a problémára a filoxérával szemben ellenálló alanyok használata jelentette, amelyekre a nemes *V. vinifera* fajtákat oltják. Az ellenálló alanyok és ún. direkttermő fajták nemesítésével a 19. sz. második felében kezdetét vette a szőlő rezisztencia-nemesítése Európában (ALLEWELDT és POSSINGHAM, 1988). Magyarországon a TELEKI család volt az alanynemesítés legnevesebb képviselője, akik feltehetően különböző észak-amerikai *Vitis* fajok szabadbeporzású állományából szelektált alanyfajtaikkal ('Teleki 5C', 'Teleki 5BB') írták be magukat a szőlőnemesítés történelmébe (BAKONYI és BAKONYI, 2002).

A lisztharmat (*Uncinula necator*), a filoxéra (*Daktulosphaira vitifoliae*) és a peronoszpóra (*Plasmopara viticola*) által előidézett gazdasági katasztrófa hatására indult meg Európában a betegség-ellenálló szőlőfajták nemesítése elsősorban Észak-Amerikából származó vad fajok bevonásával (1. táblázat). A lisztharmattal és peronoszpórával szembeni ellenállóság, valamint az európai borszőlő-fajták minősége egyaránt poligénes tulajdonságok, amelyeket egy genotípusban kombinálni rendkívüli nehézséget jelent, az interspecifikus fajták elsősorban asztali borok készítésére voltak alkalmasak. A borpiac 20. sz.-i változásainak következtében a franko-amerikai hibridek a 1960-as évek végére nagyrészt kiszorultak a termesztésből, minőségi bort – általában alanyra oltott – *V. vinifera* fajtákból készítettek (THIS és mts., 2006, KOZMA, szóbeli közlés).

Mind környezetvédelmi, mind pedig gazdasági szempontból elengedhetetlen a magasfokú rezisztenciákkal és minőséggel rendelkező szőlőfajták előállítására és a gyakorlatba történő bevezetése. A legtöbb nemesítőműhely a mai napig folytatja fajhibrideken alapuló nemesítési programjait. Az újabb (mono-, illetve oligogenikus) rezisztenciaforrások bevonása lehetővé teszi a visszakeresztezési programok következetes végigvitelét. Mára számos országban bejelentésre kerültek olyan fajhibrid szőlőfajták, amelyek bora nem, vagy csak nehezen különböztethető meg a tiszta *V. vinifera* fajták borától (ALLEWELDT és POSSINGHAM, 1988; BOUQUET és mts., 2000).

Magyarországon a borszőlőfajták rezisztencianemesítése direkttermők visszakeresztezésével kezdődött a 20. sz. közepén, majd franco-amerikai (elsősorban Seyve-Villard) hibridek felhasználásával folytatódott. A nemesítői munka eredményei a ma már termesztésben lévő multirezisztens hibridek: a 'Bianca', 'Csillám', 'Zalagyöngye', 'Viktória gyöngye', stb. (KOZMA, 2002).

A filoxéravész ugyanakkor feltehetően drasztikusan lecsökkentette a szőlőfajták variabilitását, a mai genetikai háttér már csak töredéke a korábbinak. Az elmúlt ötven év során a termesztett szőlő újabb drámai variabilitás-csökkenésnek esett áldozatul, amikor a borászati cégek és a borpiacon globalizációjának hatására egy-két népszerű világfajta ('Chardonnay', 'Cabernet Sauvignon', 'Merlot') felemelkedett és azóta is uralja a fajtasortimentet (THIS és mts., 2006). Bár a világon több mint 10 000 szőlőfajtát tartanak számon (ALLEWELDT és DETTWEILER, 1994), ezek nagy része mára már csak gyűjteményekben, génbankokban található meg.

A csemegeszőlő-nemesítés jelentős eredményeket ért el már a 19. sz.-ban és a 20. sz. elején, amikor Olaszországban BRUNI, PROSPERI és PIROVANO ('Itália' fajta), Franciaországban VIBERT és MOREAU-ROBERT ('Madeleine Royale', a 'Müller Thurgau' pollenadója, DETTWEILER és mts., 2000), az Egyesült Királyságban FOSTER és THOMSON, Magyarországon pedig MATHIÁSZ JÁNOS és STARK ADOLF ('Csaba gyöngye') nemesítettek csemegeszőlő-fajtákat. A nemesítők viszonylag szűk fajtasortimentet használtak fel keresztezéseikben, mint pl. a 'Chasselas', 'Afuz ali', 'Alexandriai muskotály' (VARGAS és mts., 2009). Ez utóbbi fajta a Nemzetközi Szőlőfajta Katalógus³ (VIVC, *Vitis* International Variety Catalogue) adatai szerint 191 szőlőfajta szülőkombinációjában szerepelt.

A csemegeszőlő piacának fejlődésével, valamint a trópusi csemegeszőlő-termesztés terjedésével párhuzamosan a csemegeszőlő fajtákkal szemben egyre inkább alapvető igény a magvatlanság (sztenospermokarpia). Ennek megfelelően a korszerű programok mindegyikében magvatlan csemegeszőlő-fajták nemesítése az egyik fő cél (TROGGIO és mts., 2008).

³ <http://www.vivc.bafz.de>

Csemegeeszőlő-nemesítés Magyarországon

A magyar csemegeeszőlő-nemesítés megalapítója MATHIÁSZ JÁNOS volt, aki előbb Szőlőskén, majd Kecskemét mellett, Katonatelepen nemesített csemegeeszőlőt. A kezdeti nemesítés célja korai, nagy és tetszetős fürtű, nagy és ízletes bogyójú csemegeeszőlő kialakítása volt. Munkásságának eredménye az 'Erzsébet királyné emléke', 'Ezeréves Magyarország emléke', 'Mathiász Jánosné', 'Cegléd szépe' és 'Szőlőskertek királynője muskotály' fajták, amelyek közül nem egy a mai napig fontos nemesítési alapanyagnak számít világszerte. A legtöbb szerző MATHIÁSZ nevéhez köti a világ egyik legkorábban termő csemegeeszőlő fajtáját, a 'Csaba gyöngyét' is, amelyet azonban már STARK ADOLF szelektált és nevelt fel (PETTENKOFFER, 1930; CSEPREGI és ZILAI, 1988; HAJDU, 2003). Az utóbbi időben végzett molekuláris vizsgálatok azonban cáfolják a fajta feltételezett származását, a 'Bronnerstraube' × 'Ottonel muskotály' szülőpárt nem igazolja a fajták RAPD (KOZMA és mts., 2003) és mikroszatellit ujjlenyomata (KISS és mts., 2005; GALBÁCS és mts., 2009). Ezen eredményekkel összhangban BOURSQUOT (2007)⁴ a 'Madeleine angevine' fajtát javasolja anyai szülőpartnerként, a pollenadó fajta pedig feltehetően a 'Muscat Fleur d'Oranger'.

KOCSIS PÁL Kecskeméten végezte munkáját, korai, ízletes, szárazságtűrő fajta nemesítését tűzte ki célul. Munkássága eredménye az 'Irsai olivér', 'Gloria Hungariae', 'Kocsis Irma' és 'Attila' fajták. SZEGEDI SÁNDOR Kecskeméten *V. vinifera* fajták mellett franko-amerikai hibridek felhasználásával is állított elő csemegeeszőlő-fajtákat. Fajtái közül a legfontosabbak a 'Pölöskei muskotály', 'Téli muskotály', 'Kósa', 'Narancsízű', 'Boglárka', 'Favorit' és a 'Teréz' (HAJDU, 2002). A Kecskeméti Szőlészeti Borászati Kutatóintézetben elődei munkáját jelenleg HAJDU EDIT folytatja, elsősorban klónszelekcióval.

Az Egri Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet jogelődjén CSIZMAZIA JÓZSEF és BEREZNAI LÁSZLÓ szintén franko-amerikai hibridek visszakeresztkezésével állítottak elő új, rezisztens fajtákat, legfontosabb csemegeeszőlő fajtáik a 'Zalagyöngye' és a 'Nero'.

A Budapesti Corvinus Egyetem Szőlészeti Tanszékének jogelődjén KOZMA PÁL kezdte meg munkatársaival a keresztezéses és szelekciós nemesítést az 1940-es évek végén. Csemegeeszőlő-nemesítési munkájában hangsúlyt helyezett a muskotályos ízre és részben a fagy- illetve téltűrésre, a betegségellenállóságra, a termésidőre és a szállíthatóságra. Bor- és csemegeeszőlő-nemesítési tevékenysége során közel 10 000 *V. vinifera* és interspecifikus magoncot állított elő. Legfontosabb csemegeeszőlő fajtái a 'Palatina' ('Augusztusi muskotály') és a 'Kozma Pálné muskotály'. A rezisztencianemesítésben 'Seibel' és 'Seyve-Villard' franko-amerikai hibrideket használt rezisztenciaforrásként. SZ. NAGY LÁSZLÓ – immár magán-nemesítőként – részben továbbvitte KOZMA PÁL munkáját. (SZ. NAGY, 2002)

⁴ BOURSQUOT, 2007, 244. o.

A Budapesti Corvinus Egyetem Genetika és Növénynevelés Tanszékének jogelődjén KOLEDA ISTVÁN *V. amurensis* RUPRECHT génforrást használt rezisztencianemesítési programjában. Munkáját KORBULY JÁNOS folytatta, továbbra is a *V. amurensis* fajra, illetve lisztharmat-ellenállóság szempontjából a 'Dzsandzsál kara' fajtára alapozva bor- és csemegeszőlő-nemesítési munkáját, amelyben a csemegeszőlő esetében már a magvatlanság is megjelent nemesítési célként.

Legutóbb a Pécsi Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetben ifj. KOZMA PÁL kezdett csemegeszőlő-nemesítési programot, amelynek elsődleges célja a magas szintű, „teljes” rezisztencia elérése lisztharmattal és peronoszpórával szemben. Rezisztencia-forrásként *Vitis rotundifolia* × *V. vinifera* BC₄ nemzedékéből származó hibridet keresztezett vissza magvatlan fajtákkal. A *V. rotundifolia* eredetű, immunitás szintű domináns lisztharmat-rezisztencia védelme érdekében a nemesítési programban ezt a gént kombinálja a *V. vinifera* eredetű, szintén domináns *Ren1* génnel. A keresztezési programban magvatlanság forrásként *V. vinifera* fajtákat ('Kismis vatkana', 'Kismis moldavszkij', 'Superior seedless', 'Festival seedless') használ.

3.3.1. A szőlő magvatlanságának típusai

A termesztett szőlőfajták között két eltérő magvatlansági formát ismerünk: a partenokarpiát és a sztenospermokarpiát (BÉNYEI és mts., 1999). Partenokarp termés jellemzi a mazsolaszőlő céllal termesztett 'Fekete korintusi' fajtát, míg a magvatlan csemegeszőlő-fajták esetében a sztenospermokarpia a magvatlanság alapvető formája.

A partenokarp magvatlanság esetében megtermékenyítés nem történik, a bogyók teljes mértékben magvatlanok. A szőlőnél STOUT (1936) megkülönböztetett fakultatív és obligát partenokarpiát. Fakultatív partenokarpiára különböző mértékben és környezeti tényezőktől függően minden fajta hajlamos, legyen az magvas vagy sztenospermokarp magvatlan. Az ún. partenokarp fajták ugyanakkor obligát partenokarpiát mutatnak: az embriózsákok nem funkcióképesek, így a megtermékenyítés nem történik meg a fürt egyetlen bogyójában sem. A partenokarp bogyók aprók, így azt a friss fogyasztásra szánt csemegeszőlők nemesítésében kevésbé használják, elsősorban mazsolaszőlő termesztésében van jelentősége.

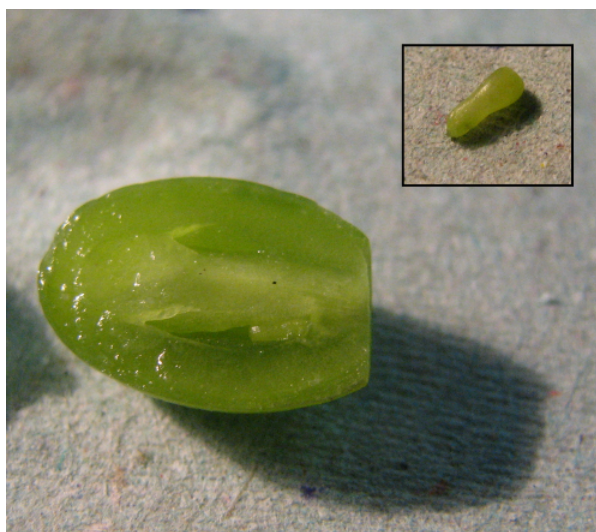
Az egyes szőlőfajtákra jellemző sztenospermokarp magvatlanság (6. ábra) jelenségét PEARSON (1932) írta le, STOUT (1936) jellemzete részletesen. A sztenospermokarp bogyókban a megtermékenyülés bekövetkezik ugyan, ám magok nem fejlődnek ki teljesen az embrió és/vagy az endospermium korai abortálódása miatt. A sztenospermokarp fajták virágai általában hímnősek, funkcionálisak, a 'Thompson Seedless' pollenje 90 %-os csírázást mutat cukor-agar táptalajon, így pollenadónak kiválóan alkalmas. A sztenospermokarp fajták megfelelő terméséhez szükség van megporzása és termékenyülésre. Ezeknél a fajtáknál is előfordul fakultatív partenokarpia, ám ennek mértéke általában nem haladja meg a magvas fajtáknál tapasztaltakat.

A sztenospermokarpiára hajlamos fajtáknál a magkezdemények épek, ám megporzásakor a belső integumentum megnyúlt, a csírapu mérete pedig meghaladja a magvas fajtáknál tapasztalható méreteket. STOUT (1936) vizsgálatai alapján a sztenospermokarp bogyókban a legtöbb termő egyes magkezdeményeibe eljut a pollen csíratömlője, ezekben általában bekövetkezik a megtermékenyülés, ám az embriófejlődés megreked. A sztenospermokarp bogyók a legtöbb esetben tartalmaznak többé-kevésbé fejlett magkezdeményeket, ám azok általában puha szövetűek.

Az ilyen bogyók – bár méretük elmarad a magvas csemegeszőlő-fajták bogyóméretétől – jóval nagyobbak, mint a partenokarp magvatlan fajták bogyói, így a csemegeszőlő nemesítésben elsősorban a sztenospermokarpiára hajlamos fajtákat használják magvatlanság-forrásként. A magvatlanság mértéke széles skálán mozog: az apró, de érezhető magkezdeményektől a nagy, de szinte észrevehetetlen magkezdeményekig a tulajdonságnak számos típusa van (STRIEM és mts., 1992). A magvatlanságra történő nemesítés során ezért problémát jelent, hogy a tulajdonság kvantitatív jellegű, ugyanis a szabad szemmel nem látható magokkal rendelkező bogyókat ugyanúgy magvatlannak tekintjük, mint az egy-két mm-es, puha magkezdeményeket tartalmazó bogyókat.

Mind a termesztés, mind pedig a nemesítés egyik legfontosabb magvatlanság-forrása a 'Thompson Seedless' syn. 'Sultanina' fajta. A VIVC adatai szerint a fajta több mint 100 magvatlan keresztezésben szerepelt közvetlen szülőpartnerként a második generációs 'Thompson Seedless' leszármazottakat nem számítva. Több fajtánál anyai és apai vonalon is megtalálható a fajta, pl. a 'Flame Seedless' esetében [('Cardinal' × 'Sultanina') × (('Red Malaga' × 'Tifafihi Ahmer') × ('Alexandriai muskotály' × 'Sultanina'))] (10. ábra a 49. oldalon). Kisebb mértékben használják magvatlanság forrásként pl. 'Sultanina rose' syn. 'Kismis rozovij' és a 'Black monukka' fajtákat.

A nemesítés mellett a szőlő magvatlansága előidézhető vegyszeres kezelésekkel is. Gibberellinsavval régóta indukálnak magvatlan fürtöket magvas fajtákon (DASS és RANDHAWA, 1968). A magvatlanság kiváltható sztreptomocinnal is (POMMER és mts., 1996), a magvatlanság miatt bekövetkezett bogyóméret-csökkenés pedig gibberellinsavval ellensúlyozható (IKEDA és mts., 2004).



6. ábra: A 'Thompson Seedless' sztenospermokarp fajta bogyója és abortálódott magkezdeménye (beépülő kép). Fotó: 2009. július 6.

A magvatlan csemegeszőlő nemesítés hatékonyságának növelése embriómentéssel

A magvas \times magvatlan szülőpárosítások utódnemzedékeiben – szülőpárosítástól függően – a kívánt mértékű magvatlanság aránya alacsony (LOOMIS és WEINBERGER, 1979), a nemesítés hatékonyságának növelése érdekében nagy erőket mozgattak meg a magvatlan \times magvatlan keresztezésekből kiinduló embriómentés kidolgozásának érdekében.

Mind magvas \times magvatlan, mind pedig magvatlan \times magvatlan keresztezésekből, továbbá magvatlan egyedek öntermékenyítéséből kíséreltek meg embriómentést CAIN és mts. (1983). Egyes keresztezésekből a táptalajra helyezett magkezdemények 25 %-ában sikerrel neveltek tovább embriókat. BARLASS és mts. (1988) arról számoltak be, hogy a magvatlanságra történő nemesítés során a hatékonyság akár 85 %-kal növelhető embriómentéssel. AGÜERO és mts. (1995) a fürtök növekedésgátlókkal történő kezelésével tovább növelték az embriómentés hatékonyságát. A magkezdemények embrióinak mentése mellett TSOLOVA és ATANASSOV (1994) megkísérelték a spontán poliembriónia kihasználását és a másodlagos embrióképződés indukálását, ily módon az életképtelen embriókból is növények nevelhetők.

A rezisztens, magvatlan csemegeszőlő nemesítése érdekében RAMMING és mts. (2000) magvatlan hibridet kereszteztek *V. rotundifolia* fajjal, az utódnemzedéket embriómentéssel nevelték fel. Hasonló stratégiát követtek TIAN és mts. (2008) kínai vad szőlőfajok felhasználásával.

3.3.2. A szőlő-magvatlanság genetikai háttere

A magvatlan csemegeszőlővel foglalkozó nemesítők a kezdetektől fogva arra törekedtek, hogy a magvatlanság genetikai hátterét minél jobban megismerjék. Bár a sztenospermokarp magvatlan típusok nagy változatosságot mutatnak, számos keresztezéses kísérlet arra engedett következtetni, hogy a tulajdonságot behatárolható számú gén határozza meg. Ugyanakkor a gének számát és jellegét tekintve a feltételezések igen eltérőek voltak (2. táblázat).

Magvatlan csemegeszőlő nemesítési programjának eredményeinek ismertetése során STOUT (1939) a Korintusi fajták hibridcsaládjaiban

2. táblázat: A magvatlanság öröklődésével kapcsolatos feltételezések. (BOUQUET és DANGLOT, 1996 alapján módosítva)

Öröklődés	Szerzők
1 recesszív gén	CONSTANTINESCU és mts., 1972
2 recesszív gén	SPIEGEL-ROY és mts., 1990
több recesszív gén	WEINBERGER és HARMON, 1964 LOOMIS és WEINBERGER, 1979 POSPISILOVA és PALENIK, 1988
Mennyiségi faktorok	SANDHU és mts., 1984
5 domináns gén	SATO és mts., 1994
3 domináns gén	LEDBETTER és mts., 1994
1 domináns gén	STOUT, 1939, 1936
1 domináns és 3 recesszív gén	BOUQUET és DANGLOT, 1996

nem talált partenokarp utódokat, míg az elterjedten használt sztenospermokarp magvatlan fajták egy része ('Concord Seedless', 'Sultana') nem örököltette a magvatlanságot, míg másik részük

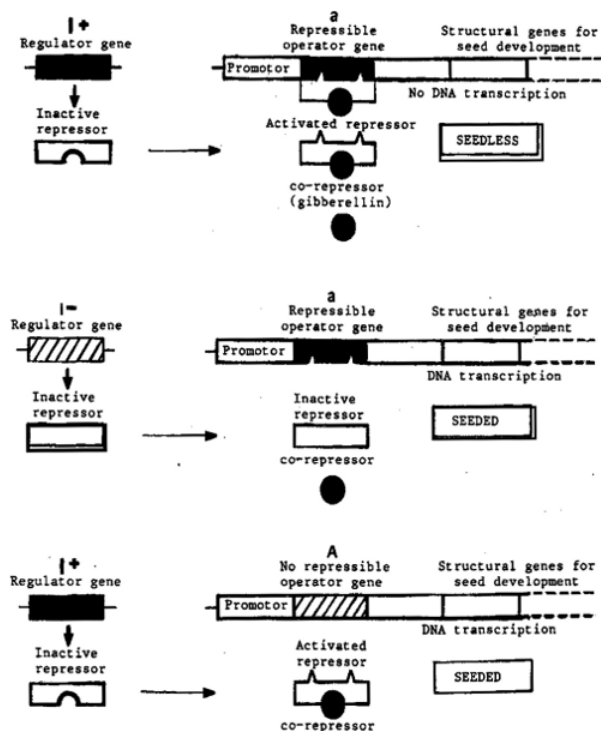
('Thompson Seedless', 'Black monukka') közel 1:1 arányú hasadást eredményezett az F_1 nemzedékben. Eredményei alapján STOUT arra a következtetésre jutott, hogy a 'Thompson Seedless' magvatlanságát egy domináns gén határozza meg.

Az egyetlen domináns génnel történő öröklődéssel szemben LOOMIS és WEINBERGER (1979) számos magvas \times magvatlan keresztezés utódnemzedékének, illetve magvatlan típusok öntermékenyítéséből kapott nemzedékek értékelése alapján megerősítették WEINBERGER és HARMON (1964) hipotézisét, amely szerint a szőlő sztenospermokarp magvatlansága recesszív tulajdonság, amelyet egynél több recesszív gén határoz meg. SPIEGEL-ROY és mts. (1990) szintén magvas és magvatlan fajták keresztezései alapján két recesszív génnel magyarázták a tulajdonság öröklődését. Ugyancsak a recesszív öröklődés mellett tette le voksát ROYTCHEV (1998), aki 27, többféle magvatlanság-forrásra épülő hibridcsaládot értékelte magvatlanság szempontjából.

Magvas \times magvatlan keresztezésekből kapott utódnemzedékek magvatlanság-fenotípusában megtalálható széles és folyamatos skála alapján a magvatlanságot SANDHU és mts. (1984) teljes mértékben mennyiségi tulajdonságként kezelik (LEDBETTER és RAMMING, 1989).

A recesszív gének és a mennyiségi jelleg mellett SATO és mts. (1994), valamint LEDBETTER és mts. (1994) többféle magvatlanság-forrás alapján 5, illetve 3 domináns génnel magyarázták a sztenospermokarp magvatlanság öröklődését.

A sztenospermokarp bogyók magjainak részletekbe menő vizsgálatához STRIEM és mts. (1992) 'Oz' és 'Early muscat' anyanövényeket ugyanazzal a magvatlan pollenadóval ('Flame Seedless') kereszteztek. Eredményeikkel bebizonyították, hogy a sztenospermokarp szőlőfajták magkezdeményének burka és az endospermium fejlettsége külön, egymástól függetlenül öröklő tulajdonságok, ugyanakkor KORKUTAL (2005) az embriók abortálódását az integumentum fejlődésének zavaraival magyarázza.



7. ábra: A sztenospermokarp magvatlanság öröklődésének modellje. Három recesszíven öröklődő faktor expresszióját egy domináns (inhibitor) faktor irányítja. A gént később magfejlődés inhibitornak (*sdI*, seed development inhibitor) nevezték el. (BOUQUET és DANGLOT, 1996)

A jelenleg legelfogadottabb modellt – amelyet azóta több térképezési munka is alátámasztott – BOUQUET és DANGLOT (1996) állította fel. Tanulmányukban magvas \times magvatlan, valamint magvatlan \times magvatlan keresztezések utódnemzedékeit egyaránt vizsgálták. Modelljük három, egymástól függetlenül öröklődő recesszív gént feltételez, amelyek expresszióját egy domináns regulátor (inhibitor) gén szabályozza (7. ábra).

A sztenospermokarpiával jellemzett magvatlanság genetikai háttere a mai napig nem tisztázott tehát egyértelműen. Az, hogy különböző magvatlan szülők keresztezéséből illetve egyes magvatlan genotípusok öntermékenyítéséből kaptak magvas utódokat, kizárja a pusztán recesszív géneken alapuló öröklődést (RAMMING és mts., 1990). Ugyanakkor LOOMIS és WEINBERGER (1979) véleménye szerint az egyetlen domináns génnel történő öröklődés sem valószínű, mivel magvas és magvatlan szülőpárosítás esetén – szülőválasztástól függően 10-30 % – arányban jelennek meg magvatlan utódok.

A magvatlanság és a bogyóméret genetikai térképezése

Amennyiben a szőlő sztenospermokarp magvatlanságának kérdését nem meghatározott számú, szigorúan mendelian öröklődő génen, hanem QTL-eken (mennyiségi tulajdonságokért felelős lokuszokon) keresztül közelítjük meg, a tulajdonság genetikai hátterének megfejtéséhez vezető út következő állomását a kapcsoltsági térképek jelentik. A szőlő-genom DNS-szekvenciájának meghatározását (JAILLON és mts., 2007; VELASCO és mts., 2007) megelőzően és azt követően egyaránt több kapcsoltsági térkép készült a szőlő meghatározó mennyiségi tulajdonságainak QTL alapú térképezése során.

Az egyik első ilyen, kifejezetten a szőlő magvatlanságával foglalkozó térképet DOLIGÉZ és mts. (2002) készítették két, részben magvatlan szülő keresztezéséből [(‘Dattier de Beyrouth’ \times ‘75 Pirovano’) \times (‘Alphonse Lavallée’ \times ‘Szultanina’)] származó, 139 egyedből álló utódnemzedéken. A konszenzus térképen 250 AFLP, 44 SSR, három izonezim, két RAPD, egy SCAR és egy fenotípusos (bogyószín) markert helyeztek el. A térkép segítségével az utódnemzedéken a bogyótömeghez, a magszámhoz, a magok friss és száraz súlyához kapcsolt QTL-eket kerestek. Eredményeik alapján igazolták egy nagy QTL és három kisebb hatású QTL jelenlétét, ami BOUQUET és DANGLOT (1996) elméletét támasztja alá. A legnagyobb hatású QTL szorosan kapcsolódott a magvatlanság domináns *Sd1* génjéhez rendelt SCAR markerhez is.

Annak vizsgálatára, vajon lehetséges-e a kisebb bogyótömegű sztenospermokarp fajták esetében a bogyóméretet növelni, FANIZZA és mts. (2005) 184 tagú hasadó nemzedéken végeztek QTL analízist. Eredményeik – bár a különböző években nagy szórást mutattak – azt sugallják, hogy a bogyóméret csak a fürttömeg rovására növelhető.

'Dominga' × 'Autumn Seedless' fajták keresztezéséből kapott hasadó nemzedéken közel 600 markerrel végzett QTL elemzésükben CABEZAS és mts. (2006) a magvatlanság – a friss magtömeg – fenotípusos változatosságát közel 50 %-ban magyarázó fő QTL-t a 18-as kapcsoltsági csoportra lokalizálták.

'Ruby Seedless' és 'Thompson Seedless' keresztezéséből embriómentéssel felnevelt 144 tagú utódnemzedék felhasználásával készítettek kapcsoltsági térképet MEJÍA és mts. (2007), amelyen 247, elsősorban AFLP, SSR és ISSR markert helyeztek el. Megerősítették a magvatlanság fő QTL-jének helyzetét a 18-as kapcsoltsági csoporton és megállapították, hogy a lókusznak pleiotróp hatása van a bogyóméretre illetve tömegre és az érésidőre. A magvatlanság és a bogyóméret szorosan kapcsolt tulajdonságoknak minősültek, nem sikerült őket szétválasztaniuk. Azonosítottak továbbá négy kisebb hatású QTL-t a szőlő különböző kapcsoltsági csoportjain.

A fentiekkel ellentétben COSTANTINI és mts. (2008) az 'Itália' és 'Big Perlon' fajták keresztezéséből származó 163 tagú F₁ nemzedéken végzett térképezési munkájuk során olyan QTL-eket is azonosítottak, amelyek a magtömegtől függetlenül befolyásolják a bogyóméretet. Az összesen 413 – elsősorban ismét SSR és AFLP – markerrel felállított térkép megerősítette a magvatlanság egyik fő QTL-jét a 18-as kapcsoltsági csoporton (szintén detektáltak továbbá kisebb varianciát magyarázó QTL-eket más kapcsoltsági csoportokon), ám a magtömeg és a termésidő közötti szoros kapcsolatot (MEJÍA és mts., 2007) cáfolták.

3.3.3. Szőlő-magvatlanság markerezése

A magvatlanság csemege-szőlő-nemesítésben betöltött központi szerepének köszönhetően hamar megindult a tulajdonság marker-támogatott szelekcióját (MAS, Marker Assisted Selection) lehetővé tévő markerek keresése.

STRIEM és mts. (1996) 'Early Muscat' × 'Flame Seedless' keresztezésből származó 82 utódon végeztek RAPD analízist. 110 értékelhető oligonukleotid primer közül 12 mutatott összefüggést valamely a magvatlanságra utaló tulajdonsággal. Ezeknek a markereknek az alkalmazhatóságát nem vizsgálták azonban más hibrid családokon, továbbá nem határozták meg a kapcsoltság mértékét sem.

140 RAPD primert vizsgálva kerestek a magvatlansághoz kapcsolt markert LAHOGUE és mts. (1998). Azonosítottak két RAPD markert: az opC08-1020 és opP18-530. Az elsőből kifejlesztették az SCC8 SCAR markert, a másodikból ADAM-BLONDON és mts. (2001) fejlesztettek SSCP markert (SCP18). A két marker a magvatlanság *Sd1* génjétől egyazon irányban helyezkedik el.

A magvatlansághoz kapcsolt két mikroszatellit markert: VMC6F11 és VMC7F2 azonosítottak térképezési munkájuk során CABEZAS és mts. (2006). A VMC6F11 marker több esetben null-

allélt mutatott, így ennek alkalmazhatóságát a szerzők elvetették. A VMC7F2 marker alkalmazása nehézkesnek ígérkezik: a domináns *SdI* allélhoz kapcsolt 198 bp hosszú fragmens mellett a magvasságért felelős *sdI* allélhoz egy 200–210 bp hosszúságú allél kapcsolt, amely mindazonáltal a legtöbb esetben 200 bp hosszúságú, a fragmenshosszak között tehát mindössze 2 bp a különbség, ami jelentősen megnehezítheti az eredmények kiértékelését. A markert 23 magvatlan és 19 magvas fajtán tesztelték, a magvatlan típusok között nem találtak rekombinánsokat, azonban a magvas egyedek közül 2 rekombinánsnak bizonyult. A marker kapcsoltságát COSTANTINI és mts. (2008) is megerősítették, az *sdI* lókusztól való távolságát 0,7 cM-ban állapították meg.

A magvatlansághoz kapcsolt RFLP illetve Southern blot markereket azonosítottak YANG és mts. (2006), ám LI és mts. (2009) bebizonyították, hogy a markerekkel nem lehet különbséget tenni a magvas és magvatlan genotípusok között, továbbá a szerzők által megnevezett génnek, amelyben a marker található, nincsen köze a szőlő magvatlanságához.

A szőlő magvatlansághoz kapcsolt SCAR-CAPS marker

A dolgozatomban használt SCAR-CAPS marker kifejlesztésének körülményeit és működését az alábbiakban részletesebben bemutatom.

LAHOGUE és mts. (1998) egy magvatlanságra hasadó nemzedék csoportos elemzése (BSA, Bulk Segregant Analysis) során 140 RAPD oligonukleotidot teszteltek. A BSA során nyolc olyan oligonukleotidot azonosítottak, amelyek specifikus sávot adtak a magvatlan típusokra. A magvas genotípusra specifikus DNS-szakaszt nem találtak. Miután a csoportos elemzésbe vont 16–16 egyedet önállóan is megvizsgálták, egyetlen marker – az opC08 primerrel felszaporított 1020 bp hosszú fragmens – mutatott teljes kapcsolttságot a fenotípussal, azaz a kérdéses sáv megjelent az összes magvatlan egyedben, míg hiányzott az összes magvas egyedből. Két további oligonukleotid, az opP08 és az opC12 esetében minden magvatlan templárról felszaporodott egy fragmens (opP18-530 és opC12-950), ám ezek néhány magvas egyedben is megjelentek. További 7–7 magvas és magvatlan egyed vizsgálata során az opC08-1020 marker a magvatlanok mellett megjelent egy magvas mintában is. A kapcsolttsági elemzés alapján a magvatlan fenotípus és a markerek közötti kapcsolttság mértéke az opP18-530 marker esetében 3,5 cM, az opC08-1020 marker esetében 0,7 cM, a két marker egymástól való távolsága 4,2 cM. Az elemzések során tehát két, az *SdI* génnel kapcsolttságot mutató RAPD markert azonosítottak.

A magvatlansághoz legszorosabban kapcsolt opC18-1020 fragmens klónozásával és szekvenálásával LAHOGUE és mts. a RAPD markert továbbfejlesztették SCAR markerré (SCC8). A kérdéses szakaszra tervezett specifikus primerek mind a magvatlan, mind pedig a magvas egyedek esetében felszaporítják a várt, mintegy 1 kbp hosszú DNS-szakaszt. A PCR-terméket 6-féle restrikciós en-

zimmel hasították. A magvas és magvatlan genotípusok közötti különbségtételre a *Bgl*III restrikciós endonukleáz bizonyult alkalmasnak.

A PCR-termékek végéről a *Bg*/II restrikciós endonukleáz mindkét esetben (magvas és magvatlan) levág egy 73 bp hosszúságú darabot, a magvassághoz kapcsolt *scc8*⁻ allél esetében pedig hasítja a 777. bázisnál, míg a magvatlansághoz kapcsolt *SCC8*⁺ allél esetében ez a hasítóhely hiányzik. A PCR reakcióban specifikus primerekkel felszaporított mintegy 1014 bp hosszú terméket *Bg*/II restrikciós enzimmel hasítva tehát a magvatlanságért felelős domináns allélhez kapcsolt fragmens mérete kis mértékben csökken (73 bp), míg a magvas fenotípusért felelős allél esetében egy ~700 bp és egy ~240 bp hosszúságú szakaszt kapunk.

Az így kapott marker kodomináns, mely képes megkülönböztetni egymástól a domináns homozigóta magvatlan ($SCC8^+/SCC8^+$), a heterozigóta magvatlan ($SCC8^+/scc8^-$) és a homozigóta recesszív magvas ($scc8^-/scc8^-$) genotípusokat.

Az SCC8 SCAR-CAPS markert a szerzők tesztelték a keresztezett szülők szülein és más hasadó nemzedékeken, köztük olyanokon is, melyek pedigréjében nem szerepelt a 'Thompson Seedless' fajta. A marker minden vizsgált egyed esetében a fenotípusnak megfelelő eredmény adott.

Három további hasadó nemzedéken – amelyek mindazonáltal rokonságban vannak a marker kifejlesztéséhez használt nemzedékkel – és számos magvas és magvatlan csemegezőlő-fajtán tesztelték az SCC8 és SCP18 markereket ADAM-BLONDON és mts. (2001). Az SCP18 markert kevésbé találták használhatónak, mint az SCC8-at, az előbbi távolságát ugyanis az *SdI* lókusztól 10,8 cM-ban határozták meg. ADAM-BLONDON és mts. vizsgálataiban az *SdI* lókusztól és az SCC8 marker távolsága nagyobbak bizonyultak (4,0 cM), mint amit LAHOUE és mts. meghatároztak (0,7 cM). ADAM-BLONDON és mts. megállapítják továbbá, hogy a marker jobban használható magvatlan \times magvatlan keresztezésekben, mint magvas \times magvatlan keresztezésekben, mivel az SCC8 csupán a domináns inhibitor gént markerezi, miközben a fenotípust nagyban befolyásolják a kisebb QTL-ek (recesszív gének) is.

A fentiektől eltérő – ám továbbra is viszonylag szűk – genetikai háttéren tesztelték az SCC8 és SCF27 (MEJÍA és HINRICHSEN, 2003) markereket KÖRÖSI és mts. (2009). Ebben a tanulmányban ADAM-BLONDON és mts. (2001) eredményeihez hasonlóan detektáltak számos null allélt, ill. rekombináns egyedet. Eredményeik szerint a markerek alkalmasak az *Sdi* lókuszt nyomonkövetésére, ám megerősítik ADAM-BLONDON és mts. (2001) megállapítását, miszerint a tulajdonság öröklődésének összetett mivolta miatt a marker csak korlátozott mértékben használható, mivel a domináns *Sdi* allél szükséges, de nem elégséges feltétele a sztenospermokarp magvatlanságnak.

3.3.4. A szőlő magvatlanságáért felelős génjelöltek

Térképezési munkájuk alapján COSTANTINI és mts. (2008) megállapították, hogy az *sdI* lókusztól 0,8 cM távolságra lévő VMC7F2 mikroszatellit marker közvetlen közelében található a *Vitis vinifera* MADS Box protein 5 gén. A gén fehérje-termékéről BOSS és mts. (2002) kimutatták, hogy csak a nőivarú virágokban nyilvánul meg, a hímivarúakban nem, így feltehetően szerepet játszik a magkezdemény fejlődésében. A fehérje *Arabidopsis thaliana* homológja az *AGL11* (*AGAMOUS LIKE*), amely a magkezdemény kialakulása során fejeződik ki, szerepe ismeretlen (ROUNSLEY és mts., 1995).

'Thompson Seedless' és annak magvas mutánsán, a 'Thompson Seeded' fajtán végzett szubsztraktív hibridizációs kísérletekben HANANIA és mts. (2007) azonosítottak egy fehérjét (chloroplast chaperonin 21, ch-Cpn21), amely a magvas fajtában megnyilvánult, míg a magvatlanban nem. A fehérje dohány növényekben történő vírus-indukálta géncsendesítésével (VIGS, Virus Induced Gene Silencing) a levelek deformálódtak, klorotikus tüneteket mutattak, a magkezdemény nekrotizálódott. Paradicsomban a fehérje szövetspecifikusan – csak a termésben – történő kiütésével a paradicsom bogyók épek, ám magvatlanok lettek. Mindezek alapján úgy tűnik, a fehérje szerepet játszhat a szőlő sztenospermokarp magvatlanságában.

Ugyanebben a kísérletben azonosították a magvas és magvatlan Thompson típusban különbözőképpen kifejeződő ubiquitin extension protein S27a fehérjét, *in situ* hibridizációval azt az eredmény kapták, miszerint a fehérje magasabb szinten expresszálódik a magvatlan genotípus termőiben és magkezdeményeiben, mint a magvas genotípusában. A fehérje túltermeltetése gátolta a növényregenerálást, csendesítése az embriogén kalluszok nekrozisához vezetett. A szerzők ezek alapján arra következtetnek, hogy – mivel a fehérje bizonyítottan szerepet játszik a fejlődésben –, a magkezdeményben történő túltermelődése vezethet a szőlő sztenospermokarp magvatlanságának kialakulásához (HANANIA és mts., 2009).

4. Anyag és módszer

A részletes protokollokat, a felhasznált esetleges parancskötegeket az M2 mellékletben fejtem ki bővebben, a kísérletek során felhasznált általános oldatok, pufferek összetételét az M2.2 melléklet tartalmazza.

4.1. A vizsgált növényanyag

4.1.1. A vizsgált rózsá taxonok

A dolgozatban vizsgált rózsá taxonokat a Budapesti Corvinus Egyetem Soroksári Botanikus Kertjében fenntartott génbankban gyűjtöttük (3. táblázat, 8. ábra). A vizsgált taxonok egy részénél rendelkeztem az adott egyed kromoszóma-számára vonatkozó információval, ami nagy segítséget nyújtott az eredmények kiértékelése során.

A vizsgált egyedek kiválasztása során a legnagyobb hangsúlyt – az introgressziós folyamatokban játszott kiemelt szerepük miatt – a *Caninae* szekció képviselőire fektettem. A *Synstylae* szekciót a kulcsoportnak szánt *R. arvensis* képviselte, a *Pimpinellifoliae* szekciót 3, a *Rosa* szekciót 5 egyed képviseli, vizsgáltam továbbá egy *Cinnamomeae* rózsát (*R. blanda*). A *Caninae* szekció alszekciói közül a *Rubigineae* képviselői vannak jelen a mintakészletben a legnagyobb számban, bevontam továbbá a vizsgálatokba a *Vestitae*, *Trachyphyllae* és *Caninae* alszekciók egyes képviselőit is.

Az egyedek kiválasztása során kiemelt hangsúlyt fektettem arra, hogy szerepeljenek közöttük evolúciósan konzervált (pl. [50, 54] *R. jundzillii*), recens (pl. [23] *R. × francofurtana* F₁, [108] *R. vetvičkae*), illetve kultúr- (pl. [22] *R. × francofurtana*, [26] *R. gallica*, [65] *R. × damascena*) hibridek is.

A minták legnagyobb része a Kárpát-medence területéről, Magyarországról, Szlovákiából, Csehországból származik, ugyanakkor – mintegy kontrollként – található közöttük németországi, bulgáriai, sőt egy görög és egy olaszországi rózsá is (3. táblázat).

3. táblázat: Az AFLP vizsgálatba bevont rózsa taxonokhoz tartozó egyedek és azok ploid szintjei. A sorszám mintagyűjtési sorszám, az adott egyedek génbanki azonosítói és további információk a 11. táblázatban találhatóak. A taxonok egy részénél a vizsgált egyed kromoszómaszáma korábban meghatározásra került, egyébként pedig WISSEMAN (2003) alapján tüntettem fel a taxonra jellemző ploid szintet.

Sorsz. Taxon	Szekció, szubszekció	Ploid szint
2 <i>Rosa arvensis</i> HUDS.	<i>Synstylae</i> DC.	$2n = 2x = 14^a$
6 <i>Rosa pimpinellifolia</i> var. <i>pimpinellifolia</i> L.	<i>Pimpinellifoliae</i> DC.	$2n = 4x = 28^a$
7 <i>Rosa pimpinellifolia</i> var. <i>spinosissima</i> KOCH	<i>Pimpinellifoliae</i> DC.	$2n = 4x = 28^a$
9 <i>Rosa myriacantha</i> DC.	<i>Pimpinellifoliae</i> DC.	$2n = 4x = 28^a$
21 <i>Rosa blanda</i> AIT.	<i>Cinnamomeae</i> (DC.) SER.	$2n = 2x = 14^a$
22 <i>Rosa</i> × <i>francofurtana</i> MUENCHH.	<i>Rosa</i>	$2n = 4x = 28^a$
23 <i>Rosa</i> × <i>francofurtana</i> MUENCHH. F ₁	<i>Rosa</i>	$2n = 4x = 28^a$
26 <i>Rosa gallica</i> L.	<i>Rosa</i>	$2n = 4x = 28^b$
42 <i>Rosa gallica</i> L.	<i>Rosa</i>	$2n = 5x = 35^b$
50 <i>Rosa jundzillii</i> BESS.	<i>Caninae</i> DC., <i>Trachyphyllae</i>	$2n = 6x = 42^b$
54 <i>Rosa jundzillii</i> BESS.	<i>Caninae</i> DC., <i>Trachyphyllae</i>	$2n = 6x = 42^b$
63 <i>Rosa</i> × <i>speciosa</i> (DESEGL.) SPR.	<i>Caninae</i> DC., <i>Trachyphyllae</i>	n.a.
65 <i>Rosa</i> × <i>damascena</i> (MILL.) HURST	<i>Rosa</i>	$2n = 4x = 28^a$
68 <i>Rosa sherardii</i> DAVIES	<i>Caninae</i> DC., <i>Vestitae</i>	$2n = 5x = 35^c$
73 <i>Rosa pseudoscabriuscula</i> (R. KELLER) HENKER & G. SCHULZE	<i>Caninae</i> DC., <i>Vestitae</i>	$2n = 5x = 35^a$
75 <i>Rosa</i> × <i>spinulifolia</i> nm. <i>hawrana</i> KMET	<i>Caninae</i> DC., <i>Vestitae</i>	$2n = 4x = 28^a$
77 <i>Rosa villosa</i> L.	<i>Caninae</i> DC., <i>Vestitae</i>	$2n = 4x, 8x = 28, 56^a$
80 <i>Rosa heckeliana</i> TRATT.	<i>Caninae</i> DC., <i>Vestitae</i>	$2n = 4x = 28^d$
81 <i>Rosa caryophyllacea</i> BESS.	<i>Caninae</i> DC., <i>Caninae</i>	$2n = 6x = 42^{e,f}$
83 <i>Rosa zalana</i> WIESB.	<i>Caninae</i> DC., <i>Rubigineae</i>	$2n = 5x = 35^c$
87 <i>Rosa szabói</i> (BORBÁS) FACSAR	<i>Caninae</i> DC., <i>Rubigineae</i>	$2n = 5x = 35^c$
88 <i>Rosa rubiginosa</i> L.	<i>Caninae</i> DC., <i>Rubigineae</i>	$2n = 5x = 35^e$
89 <i>Rosa rubiginosa</i> L.	<i>Caninae</i> DC., <i>Rubigineae</i>	$2n = 5x = 35^e$
90 <i>Rosa horrida</i> FISCHER	<i>Caninae</i> DC., <i>Rubigineae</i>	$2n = 5x = 35^d$
98 <i>Rosa micrantha</i> BORRER ex SM. in SOWERBY	<i>Caninae</i> DC., <i>Rubigineae</i>	$2n = 6x = 42^e$
99 <i>Rosa micrantha</i> BORRER ex SM. in SOWERBY	<i>Caninae</i> DC., <i>Rubigineae</i>	$2n = 5x = 35^e$
101 <i>Rosa micrantha</i> BORRER ex SM. in SOWERBY	<i>Caninae</i> DC., <i>Rubigineae</i>	$2n = 5x = 35^e$
102 <i>Rosa agrestis</i> var. <i>pontica</i> DIMITR.	<i>Caninae</i> DC., <i>Rubigineae</i>	$2n = 6x = 42^c$
106 <i>Rosa agrestis</i> var. <i>albiflora</i> (OPIZ) H. BR.	<i>Caninae</i> DC., <i>Rubigineae</i>	$2n = 6x = 42^c$
107 <i>Rosa agrestis</i> var. <i>vinodora</i> (KERN.) BORBÁS	<i>Caninae</i> DC., <i>Rubigineae</i>	$2n = 6x = 42^c$
108 <i>Rosa</i> × <i>vetvičké</i> KLAŠT.	<i>Caninae</i> DC., <i>Vestitae</i>	n.a.
110 <i>Rosa gizellae</i> BORBÁS	<i>Caninae</i> DC., <i>Rubigineae</i>	$2n = 6x = 42^g$
111 <i>Rosa inodora</i> FR.	<i>Caninae</i> DC., <i>Rubigineae</i>	$2n = 6x = 42^c$
115 <i>Rosa inodora</i> FR.	<i>Caninae</i> DC., <i>Rubigineae</i>	$2n = 6x = 42^e$
117 <i>Rosa caesia</i> SM.	<i>Caninae</i> DC., <i>Caninae</i>	$2n = 5x = 35^d$
119 <i>Rosa</i> × <i>kmetiana</i> BORBÁS	<i>Caninae</i> DC., <i>Rubigineae</i>	$2n = 5x = 35^c$
123 <i>Rosa corymbifera</i> BORKH.	<i>Caninae</i> DC., <i>Caninae</i>	$2n = 5x = 35^a$
124 <i>Rosa dumalis</i> BECHST.	<i>Caninae</i> DC., <i>Caninae</i>	$2n = 5x, 6x = 35, 42^a$
125 <i>Rosa inodora</i> FR.	<i>Caninae</i> DC., <i>Rubigineae</i>	$2n = 5x, 6x = 35, 42^a$
127 <i>Rosa canina</i> var. <i>blondeana</i> (RIP. ex DÉSÉGL.) CRÉPIN	<i>Caninae</i> DC., <i>Caninae</i>	$2n = 5x = 35^a$

^a A taxonra általánosan jellemző ploid szint WISSEMAN (2003) alapján

^b A vizsgált egyed kromoszómaszáma FACSAR és mts. (1989) alapján

^c A vizsgált egyed kromoszómaszáma MALECZKA és mts. (1990) alapján

^d A vizsgált egyed kromoszómaszáma POPEK és mts. (1991) alapján

^e A vizsgált egyed kromoszómaszáma FACSAR és mts., 1991 alapján

^f A vizsgált egyed kromoszómaszáma KLÁŠTERSKÁ (1969) alapján.

^g A vizsgált egyed kromoszómaszáma KLÁŠTERSKÁ és KLÁŠTERSKÝ (1974) alapján.



(a) *R. x spinulifolia* (75; *Vestitae* alszekció) generatív hajtása



(b) *R. heckeliana* (80; *Vestitae* alszekció) generatív hajtása virágzásban



(c) *R. x vetvičkae* (108; *Vestitae* alszekció) generatív hajtása virágzásban



(d) *R. vetvičkae* (108; *Vestitae* alszekció) vacokból fejlődött áltermése, csipkebogyója



(e) *R. zalana* (83; *Rubigineae* alszekció) generatív hajtása és virágjának morfológiája



(f) *R. zalana* (83; *Rubigineae* alszekció) generatív hajtása

8. ábra: A *Caninae* szekciót képviselő egyes vizsgált egyedek. Az alszekció megnevezése előtt található mintagyűjtési számok alapján az adott egyedről további információ található a 3. és 11. táblázatokban. (Fotók: Udvardy László [a,b,c,e] és Deák Tamás [d,f])

A *CeII* vizsgálatokba vont rózsa egyedek

Az ITS-polimorfizmus vizsgálata során felhasznált rózsa taxonokat (4. táblázat) a Budapesti Corvinus Egyetem jogelődjének Soroksári Botanikus Kertjében gyűjtöttem. A *Pimpinellifoliae* szekció képviselői közül a *R. pimpinellifoliae* alfaj szintű változatait, illetve egy *R. myriacantha* és két *R. × reversa* egyedet vontam be a vizsgálatokba. A polimorfizmus összehasonlíthatósága érdekében vizsgáltam továbbá két, alfaj szinten eltérő *R. gallica* egyedet is.

4. táblázat: A *Pimpinellifoliae* szekció ITS-polimorfizmusának vizsgálatához felhasznált egyedek. A sorszámok mintagyűjtési sorszámok, az adott egyedek génbanki azonosítói és további információk a 11. táblázatban találhatók.

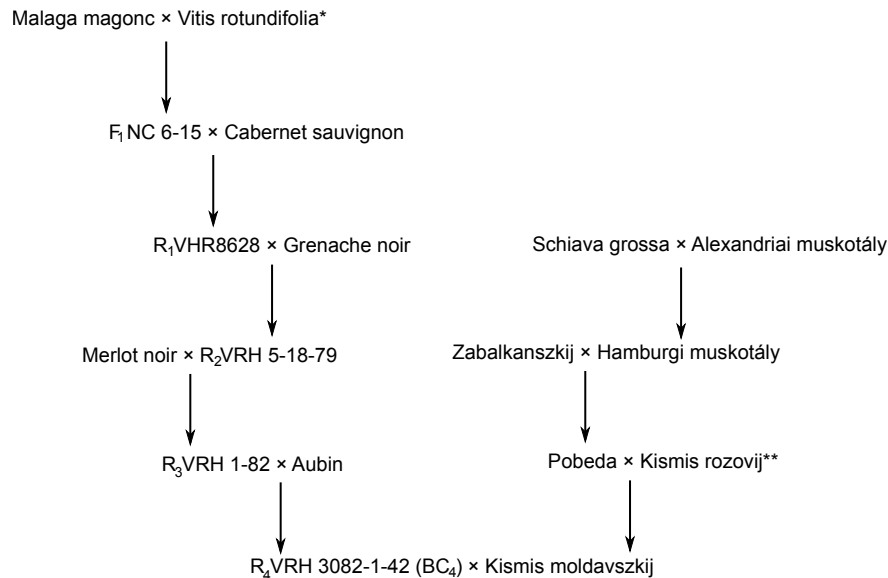
Sorszám	Taxon	Szekció
4	<i>Rosa pimpinellifolia</i> L. var. <i>spinosissima</i> KOCH	<i>Pimpinellifoliae</i> DC.
5	<i>Rosa pimpinellifolia</i> L. var. <i>pimpinellifolia</i>	<i>Pimpinellifoliae</i> DC.
7	<i>Rosa pimpinellifolia</i> L. var. <i>spinosissima</i> KOCH	<i>Pimpinellifoliae</i> DC.
9	<i>Rosa myriacantha</i> DC.	<i>Pimpinellifoliae</i> DC.
11	<i>Rosa × reversa</i> W. ET K. nm. <i>holikensis</i> (KMEŤ) SOÓ	<i>Pimpinellifoliae</i> DC.
12	<i>Rosa × reversa</i> W. ET K.	<i>Pimpinellifoliae</i> DC.
28	<i>Rosa gallica</i> L. var. <i>austriaca</i> (CRANTZ) H.BRAUN	<i>Rosa</i>
31	<i>Rosa gallica</i> L. var. <i>virescens</i> DÉSÉGL.	<i>Rosa</i>

4.1.2. A szőlő-magvatlanság markerezése során felhasznált családok

A szőlő sztenospermokarp magvatlanságához kapcsolt marker vizsgálatára a Budapesti Corvinus Egyetem jogelődjének Szőlészeti Tanszékén SZ. NAGY LÁSZLÓ által végzett keresztezésekből származó két hasadó nemzedékét, továbbá a jelenleg a Pécsi Tudományegyetemhez tartozó Pécsi Szőlészeti és Borászati Kutatóintézetben ifj. KOZMA PÁL magvatlan csemegeszőlő nemesítési programjából származó utódnemzedéket vizsgáltam.

Az első esetben a CsÉT159 ('Augusztusi muskotály' syn. 'Palatina') × 'Superior Seedless' fajtával végzett keresztezésből (9. ábra) származó utódnemzedék (TII sorozat) fenotípusos és molekuláris analízisét végeztük el. A másik vizsgált utódnemzedék a CsÉT164 × 'Flame Seedless' keresztezésből (10. ábra) származott (SI sorozat). A CsÉT164 a 'Seyve Villard 12375' (leszármazását lásd KOZMA, 2002) és az 'Olimpia' keresztezésével jött létre.

Vizsgáltam továbbá egy IFJ. KOZMA PÁL nemesítési programjából származó családot (VRH 3082-1-42 [*V. rotundifolia* × *V. vinifera*] BC₄ × 'Kismis moldavszkij'), amely a magvatlanság mellett rezisztencia géneket is tartalmaz peronoszpórával és lisztharmattal szemben (11. ábra).



11. ábra: IFJ. KOZMA PÁL multirezisztens, magvatlan csemegeszőlő nemesítési programjának általam vizsgált családjának leszármazási vonala. *: rezisztencia-forrás, **: magvatlanság forrás. (KOZMA, 2002; VIVC)

4.2. Felhasznált módszerek

4.2.1. Mintagyűjtés és DNS kivonás

A rózsá levélmintákat a gyűjtés helyszínén -196 °C hőmérsékletre hűtöttem folyékony nitrogénben, feldolgozásig -20 °C-on tároltam. A szőlő magvatlanság-vizsgálatokhoz felhasznált családok közül a TI és SII nemzedékek esetében érett vesszőt gyűjtöttem be és tároltam -20 °C-on. A BC₄ × 'Kismis moldavszkij' család esetében idős leveleket gyűjtöttem össze, amelyeket feldolgozásig fagyasztva tároltam.

Az AFLP vizsgálatokba vont rózsaminták esetében levélből, a TI és SII szőlő családok esetében a fagyasztott vesszők hancsszövetéből végeztem a DNS-kivonást Qiagen DNEasy Plant Mini Kit rendszerrel (Qiagen, Venlo, Hollandia) a gyártó utasításai szerint.

A *CelI* vizsgálatokhoz fiatal rózsá levelekből, a magvatlanság vizsgálatokhoz a BC₄ × 'Kismis moldavszkij' család esetében idős, őszi, fagyasztva tárolt levelekből XU és mts. (2004) módszere alapján tisztítottam DNS-t kisebb módosításokkal.

50 mg levélmintát dörzscsészében, hűtés nélkül tartam fel 1 ml mosópufferben (100 mM Tris-HCl [pH 8,0], 5 mM EDTA [pH 8,0], 0,35 M glükóz [Reanal, Magyarország], 2 % PVP [VWR, Spanyolország], 0,4 % 2-merkaptó-etanol [Sigma-Aldrich, USA; közvetlenül a felhasználás előtt hozzáadva]), a feltárt mintát áttöltöttem 1,5 ml-es centrifuga-csövekbe, majd vortexeltem és 30 percig jégen inkubáltam. 10 percig centrifugáltam 2 800 g-n szobahőmérsékleten, majd a felülúszót

leöntöttem. A pelletre 700 μ l feltárási puffert (100 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1,5 M NaCl, 50 mM EDTA [pH 8,0], 3 w/v % cetil-trimetil-ammónium-bromid [CTAB; VWR, Spanyolország], 0,4 % 2-merkapto-etanol [közvetlenül a felhasználás előtt hozzáadva]). A pelletet erősen vortexelve feloldottam, a mintákhoz adtam 1 μ l 10 mg/ml RNáz A oldatot, majd 30 percig inkubáltam 65 °C-on.

A mintákhoz kloroform (Reanal, Magyarország) és izoamil-alkohol (VWR, Spanyolország) 24:1 arányú keverékét (700 μ l), valamint 0,1 térfogatnyi 5 M kálium-acetátot (Reanal, Magyarország) adtam, forgatva összekevertem, majd 5 000 g-n centrifugáltam 15 percig szobahőmérsékleten. 600 μ l felülúszót átvittem új centrifugacsőbe, majd ismét hozzáadtam 600 μ l kloroform:izoamil-alkoholt, kevertem és centrifugáltam az előbbiekhöz hasonlóan. 500 μ l felülúszóhoz 1 térfogatnyi izopropanolt (Reanal, Magyarország) és 0,1 térfogatnyi 3 M nátrium acetátot (pH 5,2; Reanal, Magyarország) adtam és 20 percig inkubáltam -20 °C-on.

A mintákat 10 percig centrifugáltam 9 000 g-n szobahőmérsékleten, majd a pelletet kétszer mostam 70 % etanollal (Reanal, Magyarország): az etanol hozzáadása után 10 percig inkubáltam szobahőmérsékleten, majd 10 percig centrifugáltam szintén szobahőmérsékleten asztali centrifugában (Eppendorf MiniSpin) maximális fordulatszámon. A DNS-t 50 μ l 1 \times TE-ben oldottam vissza.

A kivont DNS-mintákat \sim 30 ng/ μ l koncentrációra állítottam be, -20 °C-on tároltam.

Az AFLP vizsgálatokhoz a DNS kivonás sikerességét és a DNS becsült mennyiségét agaróz gélelektroforézissel 1 % 0,5 \times TBE agaróz gélen ellenőriztem ismert koncentrációjú λ fág DNS-t használva markerként. A gélelektroforézis eredménye alapján a minták DNS-koncentrációját kiegyenlítettem, szükség szerint hígítással vagy alkoholos kicsapással.

Az alkoholos kicsapást 1,5 térfogat -20 °C-os absz. etanol (Reanal, Magyarország) és 0,1 térfogat 3 M Na-acetát (pH 5,2, Reanal, Magyarország) hozzáadásával végeztem (SAMBROOK és mts., 1982). Az oldatot 1 órán keresztül inkubáltam -20 °C-on, majd 10 percig centrifugáltam hűtött (4 °C) centrifugában. Centrifugálás után a felülúszót leöntöttem, kétszer mostam -20 °C-os 70 % etanollal, majd feloldottam a megfelelő mennyiségű 1 \times TE pufferben.

4.2.2. AFLP vizsgálat

Az AFLP eljárást VOS és mts. (1995) leírásának megfelelően végeztem, a felhasznált adapter- és primerszekvenciákat az 5. táblázat tartalmazza.

Mintegy 50 ng DNS-t 20 U *TruI*⁵ restrikciós endonukleázzal (Fermentas International, Kanada) hasítottam 40 μ l végtérfogatban, 1 \times OPA pufferközegben, 2 órán keresztül 65 °C-on. 20 μ l

⁵ A *TruI* enzim az AFLP vizsgálatokban legelterjedtebben alkalmazott *MseI* izoskizomerje, amellyel 37 °C helyett 65 °C-on emészthető a DNS.

TruI emésztett DNS-t 30 μ l végtérfigatban emésztettem 5 U *EcoRI* endonukleázzal (Fermentas International, Kanada) 2 órán keresztül 37 °C-on, ugyancsak a megfelelő 1 \times OPA pufferközegben.

5. táblázat: Az AFLP vizsgálatokhoz használt adapterek és primerek szekvenciái

Oligonukleotid	Szekvencia
<i>Adapterek</i>	
<i>TruI</i> „felső”	5' -CTCGTAGACTGCGTACC-3'
<i>TruI</i> „alsó”	3' -CATCTGACGCATGGAT-5'
<i>EcoRI</i> „felső”	5' -GACGATGAGTCCTGAC-3'
<i>EcoRI</i> „alsó”	3' -CTACTCAGGACTGTAA-5'
<i>Primerek</i>	
<i>TruI</i> + 0	5' -GTAGACTGCGTACCTAAT-3'
<i>EcoRI</i> + 0	5' -GATGAGTCCTGACAATTC-3'
<i>TruI</i> + CAG	5' -GTAGACTGCGTACCTAATCAG-3'
<i>TruI</i> + CTT	5' -GTAGACTGCGTACCTAATCTT-3'
<i>EcoRI</i> + ACC	5' (FAM) GATGAGTCCTGACAATTCACC-3'
<i>EcoRI</i> + ATG	5' (JOE) GATGAGTCCTGACAATTCACC-3'

Az adaptereket alkotó oligonukleotidokat (5. táblázat) 1–1 arányban elegyítve 10 percen keresztül 60 °C-on denaturáltam, majd szobahőmérsékleten hagytam lehűlni, így az adapterek két szála között kialakultak a hidrogénhíd-kötések. A *TruI/EcoRI* emésztési elegyből 20 μ l-t vittem a 40 μ l végtérfigatú ligálási reakcióba. A reakcióelegy 125 mM *EcoRI*, 125 mM *TruI* koncentrációjú volt adapterekre nézve, 1 U T4 DNS-ligázt (Fermentas International, Kanada) és 100 μ M ribo-adenozin-trifoszfátot (ATP, Fermentas International, Kanada) tartalmazott 1 \times OPA közegben. A ligálást 2 órán keresztül végeztem 37 °C-on.

A ligálási reakciót ötszörösére hígítottam, majd 4 μ l hígított ligátumot templátként használva preszelektív amplifikációt végeztem 20 μ l végtérfigatban. A PCR reakcióelegy 1 \times koncentrációjú PCR puffert (Fermentas International, Kanada) és 1 U *Taq* polimerázt tartalmazott, valamint MgCl₂-ot 2,5 μ M, a *TruI*+0 és *EcoRI*+0 primereket 0,5–0,5 μ M és a dezoxiribonukleotid keveréket (dNTP: dATP, dTTP, dCTP, dGTP) 200 μ M koncentrációban. A PCR reakciót 2 perces 94 °C-on történő elődenaturáció után 20 ciklusban GeneAmp PCR System 9700 készülékkel (Applied Biosystems, USA) végeztem: 20 másodperc denaturáció (94 °C), 30 másodperc primerkötődés (56 °C) és 2 perc lánchosszabbítás (72 °C). A preszelektív amplifikáció PCR-termékét agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem, majd az oldatot tízszeresére hígítottam.

A hígított PCR-termékből 1 μ l-nyit templátként használva 10 μ l végtérfigatban, a preszelektív amplifikációval egyező reakció-összetétellel végeztem a szelektív amplifikációt. Ennek során azonban a 20 PCR ciklust megelőzte egy „touchdown” (DON és mts., 1991) szakasz, amelyben 10 cikluson keresztül 1 °C-onként 66 °C-ról 56 °C-ra csökkentettem a primerkötési hőmérsékletet.

A szelektív amplifikáció során fluoreszcens jelöléssel (FAM vagy JOE) ellátott primerek négy kombinációját használtam: *EcoRI*+ACT, *EcoRI*+ATG, *MseI*+CAG, *MseI*+CTT (5. táblázat).

A felszaporított restrikciós fragmenseket kapilláris elektroforézissel detektáltam (ABI Prism 3100, Applied Biosystems, Foster City, USA). A futtatás eredményét a Genescan szoftverrel (Applied Biosystems) rögzítettem, majd pszeudo-gélképpé alakítottam a Genographer⁶ (BENHAM, 2001) szoftver segítségével. A gélmintázatot bináris adatmátrix-szá alakítottam (1: létező fragmens, 0: hiányzó fragmens).

4.2.3. AFPL adatok elemzése

Bináris AFLP adatok fenetikai elemzése

A bináris adatokból páronként Jaccard, Dice és Ochiai (PODANI, 1997; REIF és mts., 2005) különbözőségi indexeket (távolság-mutatókat) számoltam, minden esetben elvégeztem 1000 bootstrap minta-újravételezést. A bootstrap elemzéshez és a távolságszámításhoz az R statisztikai parancsértelmező környezetet⁷ (TEAM, 2009) használtam, az utasításköteg az M2.4 mellékletben található. A távolságszámításban az ade4 függvénykönyvtár (DRAY és DUFOUR, 2007) volt segítségemre.

A tesztelt metrikákat nem metrikus többdimenziós skálázással (Non Metric Multidimensional Scaling, NMDS) ellenőriztem. A KRUSKAL (1964)-féle MDS-en alapuló ordinációhoz az R környezet ade4 és MASS (VENABLES és RIPLEY, 2002) függvénykönyvtárait használtam (M2.4 melléklet). Főkomponens analízist (PCA, Principal Component Analysis) szintén az R környezet ade4 függvénykönyvtárával végeztem.

A különbözőség indexek alapján a Phylip⁸ programcsomag (FELSENSTEIN, 1989) neighbor programjával UPGMA fenogramokat számoltam minden bootstrap mintavételezésből. A kapott fákból a consense programmal konszenzus fát készítettem. Az UPGMA fákból Dendroscope⁹ (HUSON és mts., 2007) szoftverrel készítettem minimális konszenzus hálózatot.

Filogenetikai megközelítés

A fenti fenetikai elemzés mellett végeztem filogenetikai elemzést. A bináris adatokból neighbor-net hálózatot rajzoltam a SplitsTree¹⁰ szoftverrel (HUSON és BRYANT, 2006) 1000 bootstrap ismétlést alkalmazva. A hálózat alapját dice indexen alapuló távolságok adták.

⁶ <http://hordeum.oscs.montana.edu/genographer/>

⁷ <http://www.r-project.org>

⁸ <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>

⁹ <http://www.dendroscope.org>

¹⁰ <http://www.splitstree.org/>

A hibridizációs evolúciós modellen alapuló hálózatot (reticulate network; HUSON és BRYANT, 2006) szintén a SplitsTree4 szoftverrel készítettem.

4.2.4. Rózsa ITS fragmensek *CeII* polimorfizmusa

A genomi DNS-ről PCR reakcióval felszaporítottam az ITS régiót, A PCR reakciót standard körülmények között (M2.5. melléklet) végeztem 50 °C primerkötési hőmérséklettel, 1 perc extenziós idővel, ITS5 (5' -GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') és P2 (5' -CTCGATGGAACACGGGATTCTGC-3') primerekkel.

Az ITS-szakaszok polimorfizmusának kimutatására használt *CeII* enzimet KISS GYÖRGY BOTOND (Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont, Gödöllő) bocsátotta rendelkezésemre.

A PCR termékeket önmagukban, illetve referenciamintával 1:1 arányban elegyítve 94 °C-on denaturáltam, majd 1 órán át inkubáltam *CeII* enzimmel 37 °C-on. A vágási terméket denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel választottam el 12 %-os denaturáló gélen. A futtatás során *TruI* restrikciós endonukleázzal emésztett pKS plazmid DNS-t használtam méretmarkernek.

4.2.5. A szőlő-magvatlansághoz kapcsolt SCAR-CAPS marker

A magvatlanság nyomonkövetéséhez a LAHOGUE és mts. (1998) által kifejlesztett SCAR-CAPS markereket használtam. Az SCC8 primerpár (SCC8F 5' -GGTGTCAAGTTGGAAGATGG-3' és SCC8R 5' -TATGCCAAAAACATCCCC-3') a magvas *sdl* és magvatlan *Sdl* allélhoz kapcsolt *scc8*⁻ és *SCC8*⁺ allélokat felszaporítja standard reakciókörülmények között. A PCR reakciót 20 µl végtérfogatban, 60 °C primerkötési hőmérsékletet és 90 másodperc lánchosszabbítási időt alkalmazva végeztem.

8,5 µl PCR termékhez 5 U *Bgl*II restrikciós endonukleázt (Fermentas International, Kanada) és 1 µl 10× koncentrációjú enzim-puffert adtam, az elegyet 1 órán keresztül inkubáltam 37 °C-on. Az emésztett PCR-terméket agaróz gélelektroforézissel választottam el 1,2 %-os 1× TBE gélben.

PCR termék klónozása és szekvenálása

A PCR-termékeket homozigóta egyedek esetében folyadékból, heterozigóta egyedek esetében gélből kivágva tisztítottam High Pure PCR Product Purification Kit segítségével (Roche Applied Science, USA). 1 µl tisztított PCR terméket 0,5 µl (25 ng) pGEM-T Easy (Promega, USA) TA klónozó vektorba ligáltam 10 U T4 DNS-ligázzal (Fermentas International, Kanada), az enzimmel szállított 1× pufferközegben. A ligálási reakciót 3 órán keresztül végeztem 15 °C-on.

A ligátum 2 μ l-ével transzformáltam *Escherichia coli* DH5- α kompetens sejteket 20 perc jégen történő együtt-inkubálás után 30 másodperc 42 °C hősokkot alkalmazva. 30 perc 37 °C-on, antibiotikum-mentes, folyékony táptalajban, rázatva történő indító inkubálás után a transzformált sejtekből 50 μ l-t ampicillin antibiotikumot 100 μ g/ml koncentrációban tartalmazó LB lemezekre szélesztettem, amelyekre előzőleg 40 μ l 2 w/v% XGAL-t (5-bromo-4-kloro-3-indolil-galaktopiranozid, Fermentas International, Kanada) és 5 μ l 20 w/v % IPTG-t (izopropil β -D-1-thiogalaktopiranozid, Fermentas International, Kanada) kentem¹¹.

10–10 fehér színű telepen kolónia PCR-t végeztem SCC8F és SCC8R primerekkel 10 μ l végtérfogatban, az SCC8 markernél leírt paraméterekkel, 10 perces elődenaturációt alkalmazva. A megfelelő hosszúságú PCR termékekből alkalikus lízisen alapuló módszerrel (SAMBROOK és RUSSEL, 2001) tisztítottam DNS-t. A tisztított plazmidokat restrikciós emésztéssel ellenőriztem 2 U enzim felhasználásával, 10 μ l végtérfogatban.

A próbaemésztések alapján pozitív klónokat a Biomi Kft. (Gödöllő) szekvenálta. A szekvenciák feldolgozását az EMBL¹² (RICE és mts., 2000) programcsomag, valamint a CLC Sequence Viewer¹³ szoftver segítségével végeztem.

¹¹ Az XGAL-t az üres, önligálódott klónozó vektor intakt *lacZ* génje által termel β -galaktozidáz enzim galaktózra és bromo-kloro-hidrox-indolra bontja, ez utóbbi oxidációjával keletkező termék kék színű, így az önligálódott plazmidot felvett kék baktérium-telepek megkülönböztethetők a fehér színű, inzertet tartalmazó plazmidot hordozó baktériumtelepektől. Az IPTG laktóz-analóg a *lacZ* gén indukciójához szükséges. (SAMBROOK és RUSSEL, 2001)

¹² <http://emboss.sourceforge.net/>

¹³ <http://www.clcbio.com>

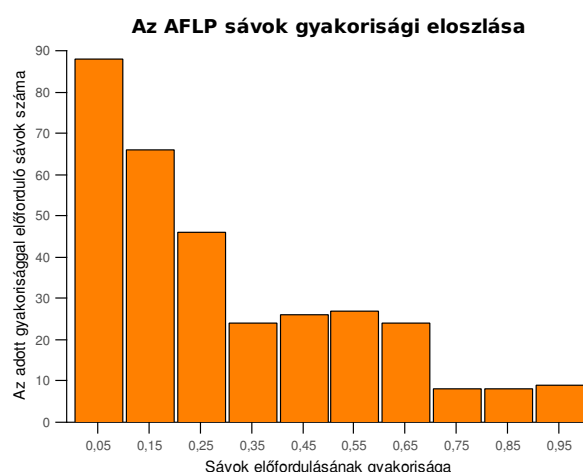
5. Eredmények

5.1. Rózsa fajok AFLP analízise

A 40 rózsamintán, 4 szelektív primerkombinációval elvégzett AFLP vizsgálat 327 polimorf lókuszt eredményezett. A lókuszok mintegy 27 %-ában 10 % alatti fragmens-gyakoriságot tapasztaltam (12. ábra), amit akár az elektroforetogramok nem megfelelő kiértékelése is eredményezhetett. Mindazonáltal ezen lókuszok kizárásával sem az ordináció stressz-értéke, sem pedig a fák topológiája és bootstrap támogatottsága nem változott jelentős mértékben, így az adatelemzés során ezeket a lókuszokat is figyelembe vettem. A markerek 12. ábrán bemutatott eloszlásából kitűnik továbbá, hogy viszonylag alacsony (7,7 %) volt azon lókuszok aránya, amelyek a vizsgált minták több mint 70 %-ában domináns fenotípust mutattak. A monomorf domináns lókuszokat a vizsgálat során nem vettem figyelembe.

A fenogramok elkészítéséhez végzett távolságszámítás során a három vizsgált metrika (Jaccard, Dice és Ochiai) gyakorlatilag egységesen ugyanazt az eredményt adta, Ochiai módszere valamivel alacsonyabb stressz-értékkel és a 2 dimenziós ordináció ábrázolása során valamivel jobban elkülönülő csoportokkal (13. ábra), ezért a továbbiakban az Ochiai indexen alapuló elemzéseket vettem alapul. A Jaccard és Dice-távolságok alapján kapott ordinációs diagramok az M3.1 mellékletben találhatók.

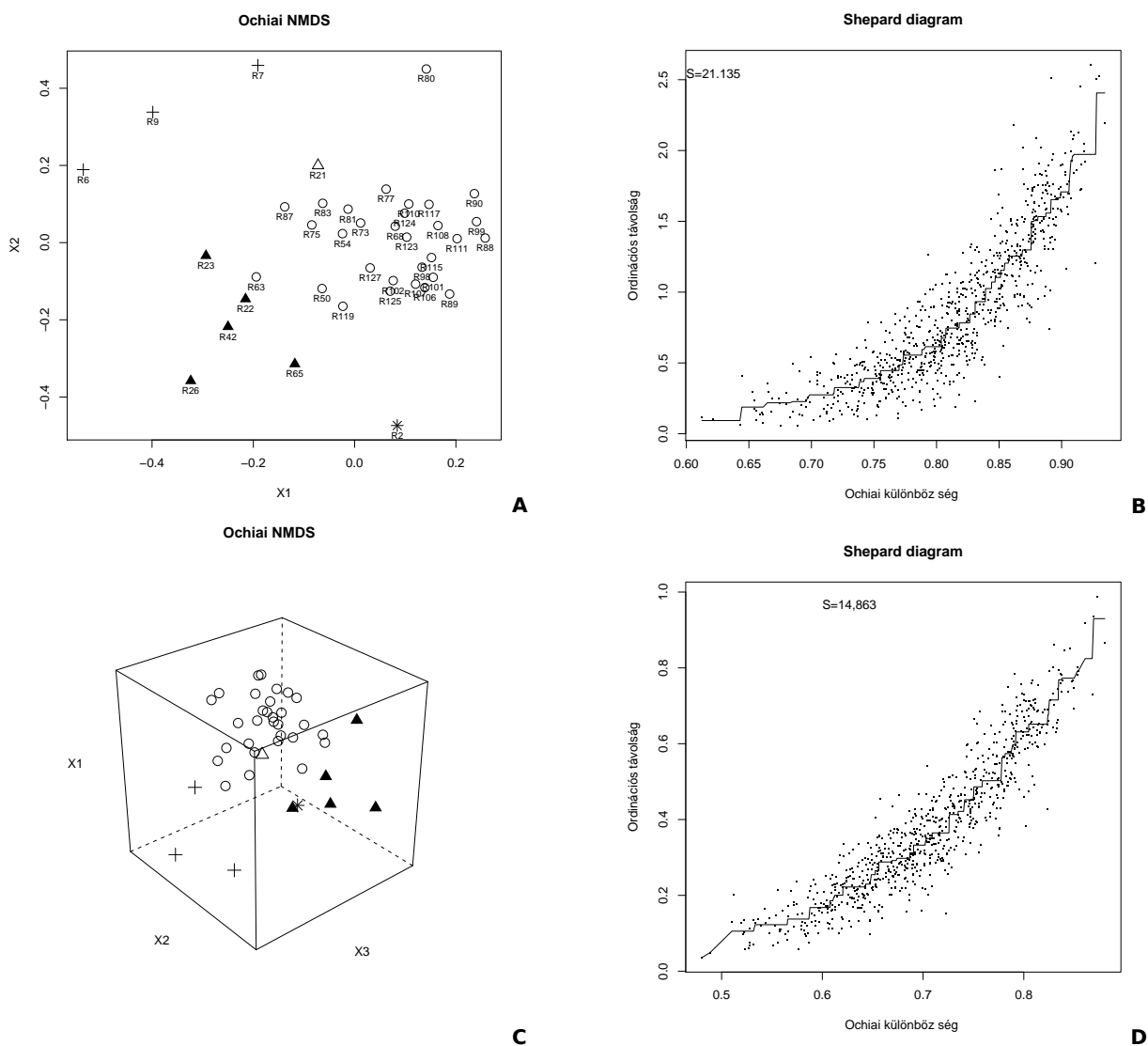
Az ordináció során kapott stressz-értékek kifejezetten magasak, azaz az ordináció távolság-értékei nem tudták pontosan megközelíteni az AFLP adatok alapján számított távolság-értékeket. Az ordináción (13. ábra) azonban így is elkülönülő csoportként jelentkezett minden



12. ábra: Az AFLP sávok gyakorisági eloszlása. A lókuszok közel 27 %-a az egyedek kevesebb mint 10 %-ában mutatott domináns fenotípust. Ezen lókuszok kizárása nem javította ugyanakkor az NMDS stressz-értékét.

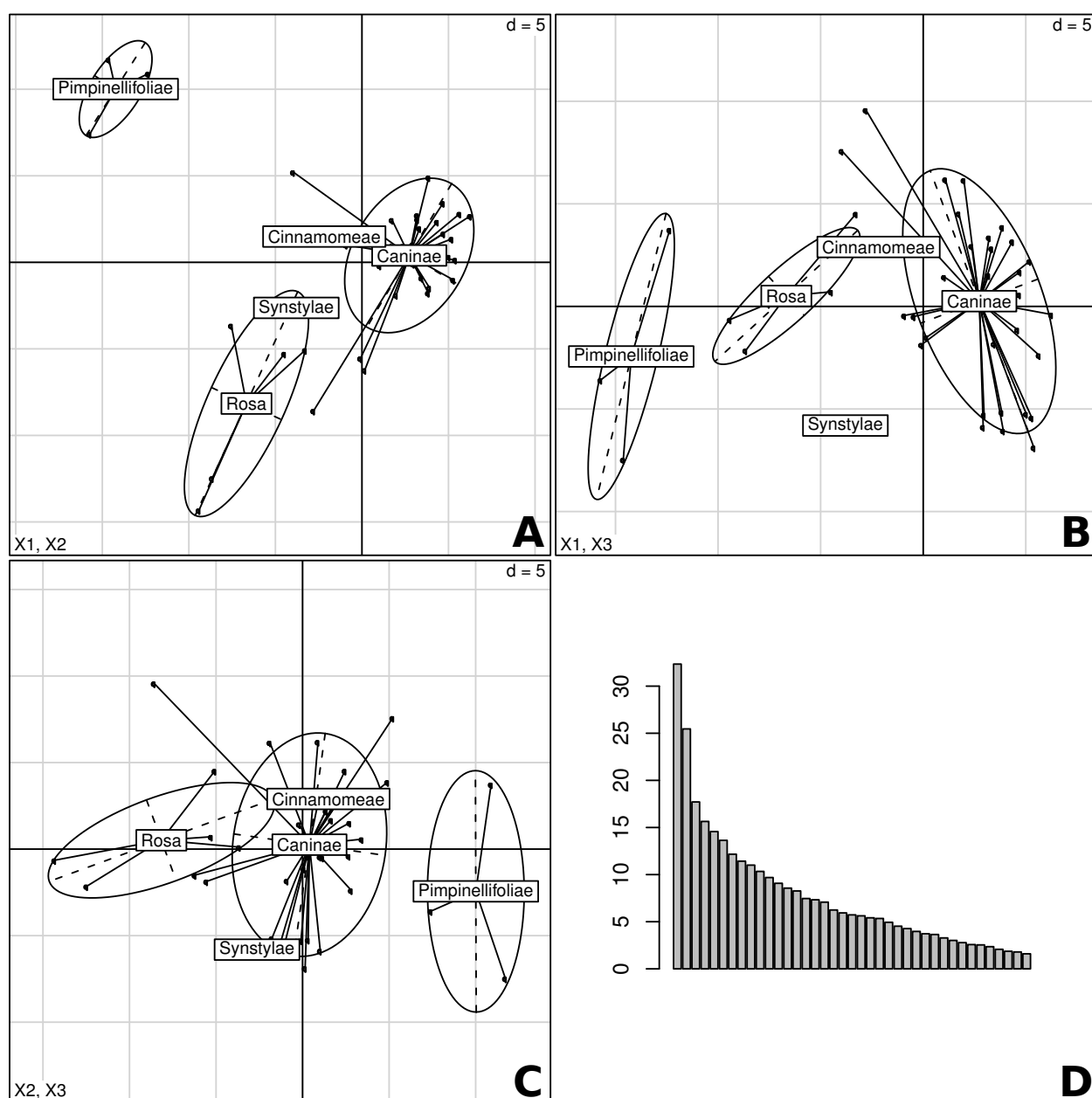
esetben – különböző metrikák, illetve 2 és 3 dimenziós NMDS – a *Pimpinellifoliae* és a *Rosa* szekció, valamint a későbbiekben kulcsoportként használt *R. arvensis* (*Synstylae* szekció). A *Cinnamomeae* szekciót képviselő *R. blanda* a *Caninae* szekció képviselőit tartalmazó pontfelhő szélén helyezkedik el.

A főkomponens analízis (14. ábra) az ordinációhoz hasonló képet mutat az adatokban rejlő szerkezetről. A 14. ábra D szekciójának alapján az első három főkomponens a teljes variancia mintegy



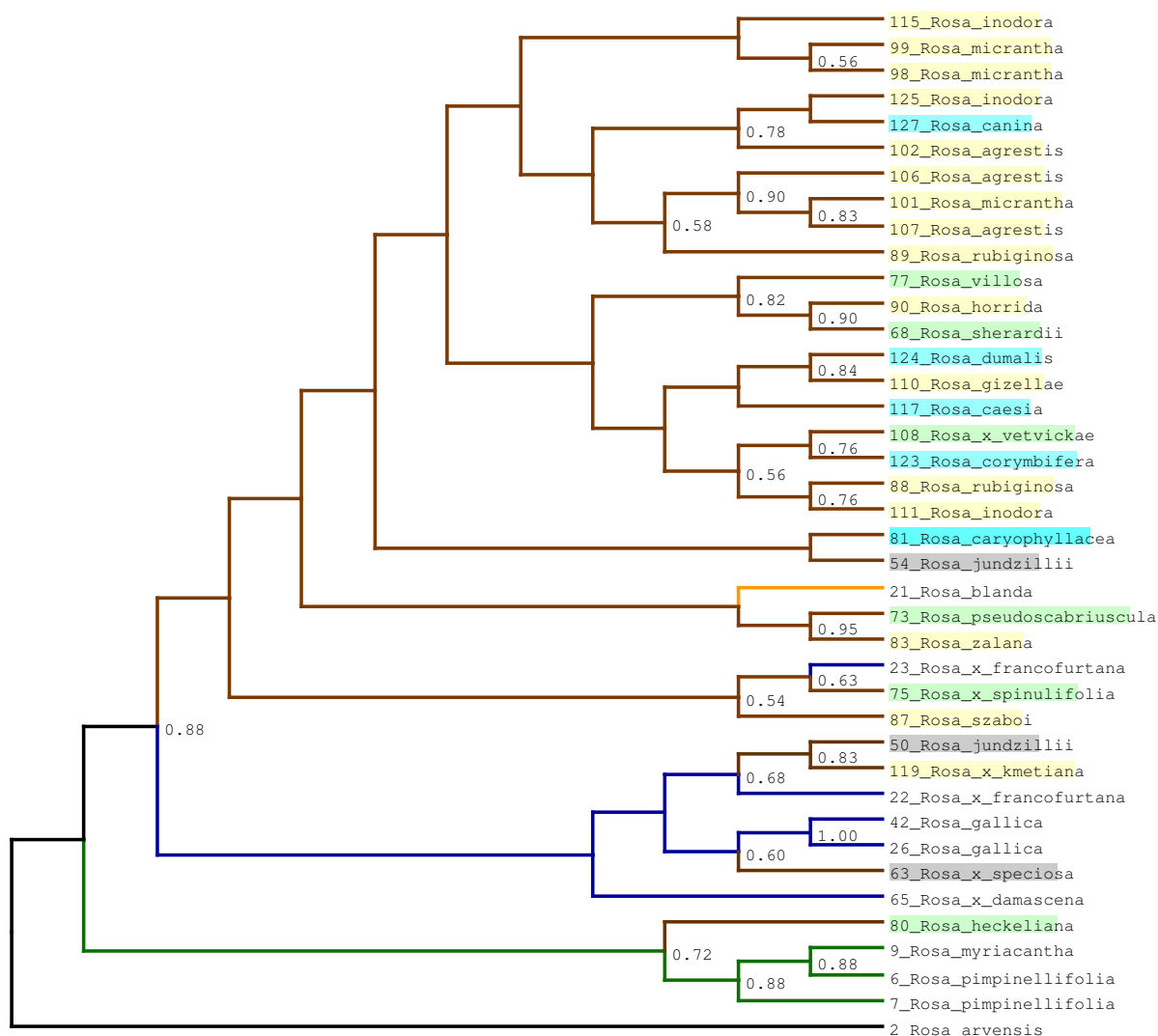
13. ábra: Ochiai különbségindexi mutatón alapuló NMDS. **(A)** A 2 dimenziós NMDS eredményének ábrázolása. Szekciók: csillag – *Synstylae*, kereszt – *Pimpinellifoliae*, sötét háromszög – *Rosa*, világos háromszög – *Cinnamomeae*, világos kör – *Caninae*. **(B)** A 2 dimenziós NMDS stressz-szintjének ábrázolása Shepard diagramon ($S = 21.135$). Az abszcissza az Ochiai indexet, az ordináta az ordinációban mért távolságot mutatja. A pontok ordináta irányú szórásával nő az ordinációt jellemző stressz-érték. **(C)** A 3 dimenziós, Ochiai indexen alapuló NMDS eredménye. **(D)** A három dimenziós NMDS Shepard diagramja ($S = 14.862$). A további távolságindexeken (Jaccard, Dice) alapuló ordinációk eredménye az M3.1 mellékletben található.

25 %-át meghatározza. A *R. arvensis* elkülönülését a C szakasz (1. és 3. komponensek) mutatja legjobban, a *Pimpinellifoliae* és *Rosa* szekciók szintén külön csoportot képeznek. A *Cinnamomeae* szekcióba tartozó *R. blanda* – az NMDS-hez hasonlóan – a *Caninae* szekcióba tagozódik, illetve közvetlenül annak peremén helyezkedik el.



14. ábra: A 40 Kárpát-medencei rózsa taxon AFLP adatai alapján végzett PCA ordináció. (A) A csoportok 1. és 2. főkomponensek mentén mutatkozó elkülönülése. (B) A csoportok elkülönülése az 1. és 3. főkomponensek mentén. (C) A 2. és 3. főkomponensek mentén feltüntetett taxonok. (D) A komponensek variancia-tényezői. Az első három főkomponens a teljes varianciának 25 %-áért felel.

A bináris adatok bootstrap ismételéseiből rajzolt konszenzus fát (15. ábra) a következőekben alulról fölfelé haladva mutatom be.



15. ábra: A 40 Kárpát-medencei rózsa taxon rokonsági viszonyait mutató dendrogram. A dendrogram 1000 véletlenszerűen újrávételezett (bootstrap) AFLP adatmátrixból Ochiai távolság-mutató alapján számolt UPGMA fák konszenzusát mutatja. Az egyes csoportok 50 % feletti támogatottságát az elágazásoknál feltüntetett bootstrap értékek jelzik. Az ágak színe a szekciót (fekete [*R. arvensis* külcsoport]: *Sysnetylae*, zöld: *Pimpinellifoliae*, kék: *Rosa*, narancssárga: *Cinnamomeae*, barna: *Caninae*), a taxonnevek háttérének színe a *Caninae* szekció alszekcióit mutatják (zöld: *Vestitae*, szürke: *Trachyphyllae*, sárga: *Rubigineae*, kék: *Caninae*).

A külcsoportként használt (2) *Rosa arvensis* a *Pimpinellifoliae* szekció jól elkülönülő kládja követi a (9) *R. myriacantha* (syn. *R. pimpinellifolia* var. *myriacantha*), (6) *R. pimpinellifolia*, (7) *R. pimpinellifolia* var. *spinosissima* taxonokkal. Szintén ebben a csoportban helyezkedik el a (80) *R. heckeliana*, amelyet a *Caninae* szekció *Vestitae* alszekciójába sorolnak. A *Pimpinellifoliae*

szekció 72 %-os, illetve a fa fennmaradó mintákat tartalmazó csoportjának 88 %-os bootstrap támogatottságú elkülönülése minden további vizsgálatban megfigyelhető volt, így ez a rendszertani csoport igazoltnak tekinthető.

A következő csoportot a *Rosa* szekció tagjai alkotják ([65] *R. × damascena*, [63] *R. × speciosa*, [42] *R. gallica* és [26] *R. gallica*). A *Rosa × damascena* több ezer éves kultúrtaxon, melynek egyik szülője a *Rosa gallica* volt, míg a (63) *R. × speciosa* a *R. gallica* és a *R. jundzillii* hibridje. Szintén ebbe a kládba tagozódott be a (22) *R. × francofurtana*, a (119) *R. × kmetiana* és a (50) *R. jundzillii* 68 % bootstrap támogatottságú csoportja. Morfológiai bélyegei alapján a *Rosa kmetiana* bizonytalan eredetű és helyzetű taxon, ugyanakkor egyértelműen a *R. gallica* az egyik szülője (FACSAR, szóbeli közlés). Szintén a *R. gallica* a pollenadó szülője a földtörténeti múltban állandósult *R. jundzillii* hibrid taxonnak, amelyet jelenleg a *Caninae* szekció *Trachyphyllae* alszekciójába sorolnak, mivel a *Caninae* szekciót meghatározó kiegyenlítettlen meiózis jellemzi.

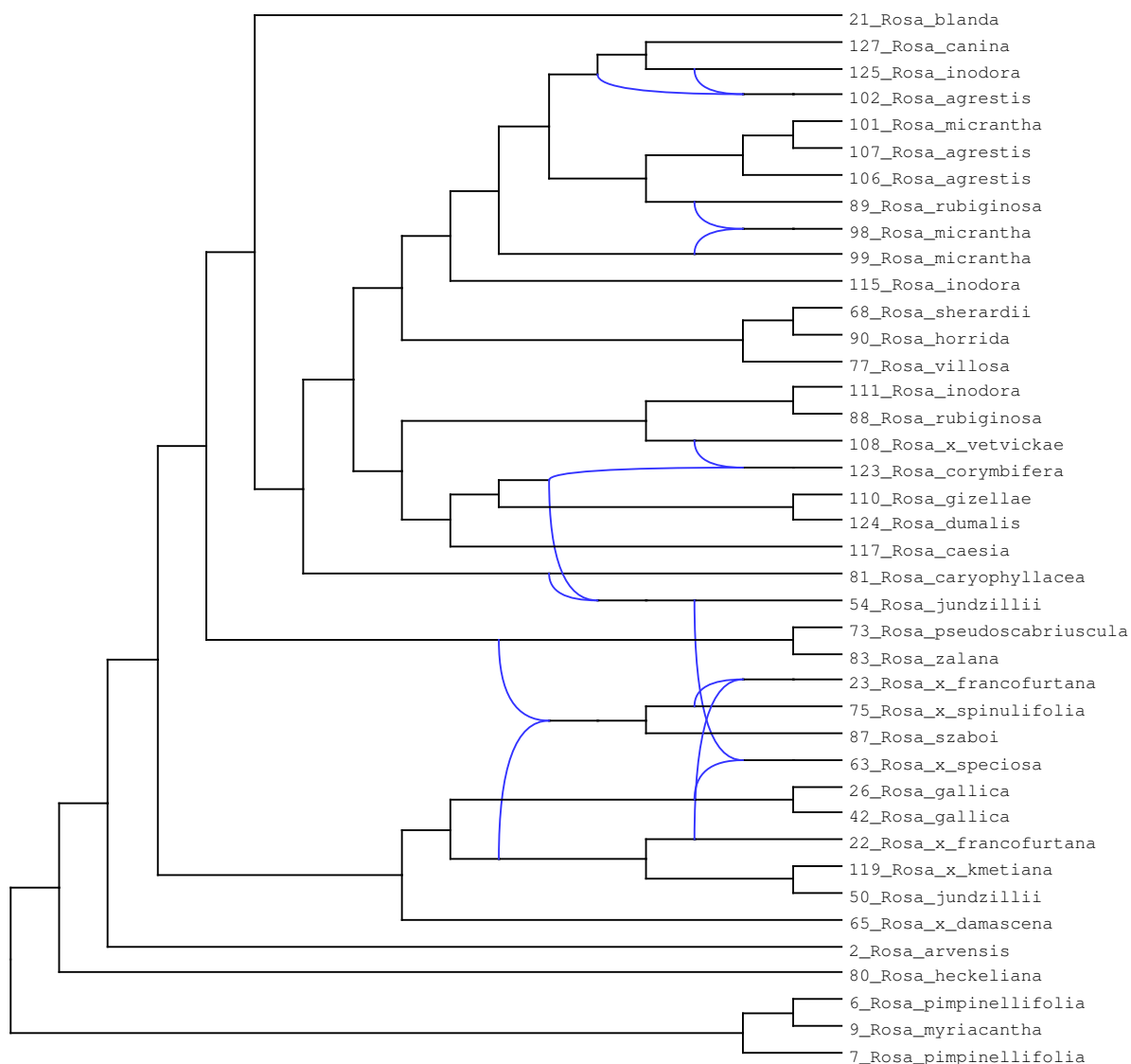
A fa legnagyobb, a fennmaradó mintákat tartalmazó kládja a jelenlegi nomenklátúra szerinti *Caninae* szekció tagjait tartalmazza. A szekción belüli elkülönülés kevésbé mutat tiszta képet. Az utóbbi időben (POPEK, 1996, 2007) összevont *Caninae* szekció megkülönböztetett csoportjai között találunk nehezen értelmezhető helyzetű taxonokat. A nagyobb csoportok bootstrap értékei alacsonyak, így messzemenő következtetések nem vonhatók le.

A fa korán leágazó kládjain található pl. a (87) *R. szabói* és (83) *R. zalana*, melyek a *Rubiginiae* alszekcióhoz állnak közelebb, ám a fán a *Vestitae* csoportba sorolt egyes taxonok mellé kerültek besorolásra. A *R. szabói* a *Caninae* szekció ágának első, 54 % bootstrap támogatottságú csoportjába, a (23) *R. × francofurtana* F₁ szabad beporzású magonca és a (75) *R. × spinulifolia* mellé került besorolásra. A *R. zalana* 95 % bootstrap támogatottságú kapcsolatot mutat egy (73) *R. pseudoscabriuscula* mintával. Szintén ezekbe a korán leágazó kis csoportokba tagozódik a *Cinnamomeae* szekció egyetlen vizsgált képviselője ([21] *R. blanda*). A (75) *R. × spinulifolia*-t egyik ágról a *Cinnamomeae* szekciótól eredeztetik.

A *Caninae* alszekciót képviselő (81) *R. caryophyllacea*, (117) *R. caesia*, (123) *R. corymbifera*, (124) *R. dumalis* és (127) *R. canina* a *Caninae* szekció kládján belül elszórtan helyezkednek el, az alszekció polifiletikus képet mutat.

Érdekes jelenség a *Vestitae* alszekció rendkívül polifiletikus jellege, bár ezt okozhatja a csoportba tartozó egyes taxonok hibriditása. A (108) *R. × vetvickae*, amely feltehetően *R. dumalis* és egy *Vestitae* csoportbeli taxon hibridje 76 %-os bootstrap támogatottságú csoportot alkot a (123) *R. corymbifera* (= *R. dumalis* BECHST. pro parte) taxonnal. A (75) *R. × spinulifolia*, amely a *R. tomentosa* és egy *Cinnamomeae* csoportbeli taxon (*R. pendulina*) hibridje, szintén a feltételezett szülő csoportjaival mutat kapcsoltságot. Hasonlóan interpretálható a (73) *R. pseudoscabriuscula* helyzete, amely szintén hibrid eredetű taxon, de csak az egyik szülő ismert (*R. tomentosa* × ?).

A mintakészletben szerepeltek olyan egyedek is, amelyek morfológiai bélyegeik alapján ugyanazon fajhoz tartoznak, ám kromoszómaszámuk eltérő (3. táblázat). Az egyik ilyen taxon a *R. gallica*, amelynek 26. sorszámú egyede tetraploid ($2n = 4x = 28$), míg 42. sorszámú egyede pentaploid ($2n = 5x = 35$). A két egyed minden vizsgálatban közvetlenül egymás mellé került besorolásra, a konszenzus fán bootstrap támogatottságuk 100 %. A másik ilyen taxon a *R. micrantha*, amelynek 98. számú egyede hexaploid ($2n = 6x = 42$) és feltehetően recens hibrid, 99. sorszámú egyede a fajra jellemzően pentaploid ($2n = 5x = 35$). Bár e két egyed hasonlóságának bootstrap támogatottsága alacsonyabb (56 %), szintén minden esetben együtt kerültek besorolásra.



16. ábra: A bootstrap elemzés konszenzus hálózata. Az AFLP adatok 1000 bootstrap újra-mintavételezéséből számított UPGMA fák minimális hálózat konszenzusa (20 % határértékkel).

Konszenzus fahálózat

Az AFLP adatok kiértékeléséhez használt fenológiai módszerek elméleti hátterük miatt nem képesek kezelni az olyan csoportokat, amelyek átmenetet képeznek két másik csoport között, azaz „nem tudnak mit kezdeni” a hibrid taxonokkal, ezért megkíséreltem az adatokban rejlő szerkezetet más megközelítésben is megvizsgálni. Amennyiben egy hibrid taxon egyaránt affinitást mutat mindkét szülő taxonjához, azt a klasszikus fák nem tudják ábrázolni, mivel mindenképpen hierarchikusan kell besorolniuk minden taxont. A bootstrap ismétlések során az ilyen, két irányba húzó hibridek miatt a csoportok bootstrap támogatása lecsökkenhet. A konszenzus fahálózatok ugyanakkor kiválóan alkalmasak lehetnek éppen az ilyen esetek értékelésére.

A bootstrap elemzés fáinak minimális konszenzus hálózatát mutatja a 16. ábra. A *Pimpinellifoliae* taxonok élesen elkülönülő csoportja itt is megfigyelhető, a szekció gyakorlatilag külcsoporthként funkcionál¹⁴. A *Pimpinellifoliae* szekciót a fán a *R. heckeliana* és *R. arvensis* elkülönülő ágai, majd a *Rosa* és *Caninae* szekciót tartalmazó csoport követik. A *Rosa* szekció a többségi konszenzus elemzéshez hasonlóan jól elkülönül, ugyanakkor kiválóan látszik a szekciók közötti hibridek kialakításában játszott szerepe. Számos hibrid, amely a többségi konszenzus fán „erőltetetten” került besorolásra, a *Caninae* és *Rosa* szekciók közötti hibrid csoportot alkot. Ilyen hibridek a (63) *R. speciosa*, a (87) *R. szabói*, (75) *R. × spinulifolia*, (23) *R. × francofurtana*; továbbá a hibridizációs folyamatokban a fa szerint szintén aktívan részt vevő (83) *R. zalana*, (73) *R. pseudoscabriuscula*, (54) *R. jundzillii*.

A (21) *R. blanda* (*Cinnamomeae* szekció) elválik a *Caninae* szekciótól. A *Caninae* alszekció tagjai ([81] *R. caryophyllacea*, [117] *R. caesia*, [124] *R. dumalis*) tagjai a fahálózatban jobban elkülönülnek, mint a többségi konszenzus fán, ugyanakkor ide tagozódik be a (110) *R. gizellae*, továbbá a (127) *R. canina* – amely nem egy típusos *canina* rózsza – a *Rubigineae* szekcióhoz sorolódik.

A hálózat konszenzus alapján megerősítést nyert, hogy a *Vestitae* szekció mintakészletünkben megtalálható egyedeinek nagy része hibrid eredetű, ezzel magyarázható tehát polifiletikus jellegük a többségi konszenzus fán. A *Rubigineae* alszekció – a *Caninae* alszekcióhoz hasonlóan – a konszenzus fahálózatban egységesebb képet mutat.

A bootstrap ismétlések konszenzus hálózata tehát jobban támogatja a klasszikus rózsza-rendszerek szekcióit és részben a *Caninae* szekció alszekcióinak elkülönítését.

A két különböző ploidisztű *R. micrantha* egyed összetartozásának alacsonyabb bootstrap támogatottsága szintén magyarázatot nyert, a 98. minta ugyanis a fahálózat alapján hibrid eredetű egyed.

¹⁴ A konszenzus hálózat esetében nincs szükség külcsoporth megadására, míg a hagyományos többségi konszenzus (15. ábra) készítéséhez a *R. arvensis*-t határoztam meg külcsoporthként.



(a) *R. micrantha* (98) generatív hajtása virágzásban



(b) *R. micrantha* (101) áltermése



(c) *R. micrantha* (98) „heteracantha” tüskézettsége



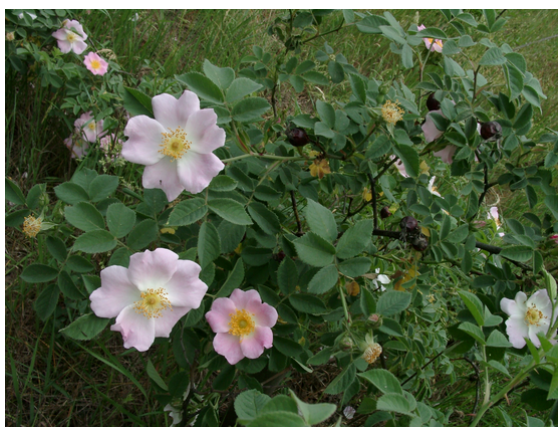
(d) *R. micrantha* (99) vacokból fejlődött áltermése



(e) *R. x kmetiana* (119) generatív hajtása



(f) *R. gizellae* (110) generatív hajtása

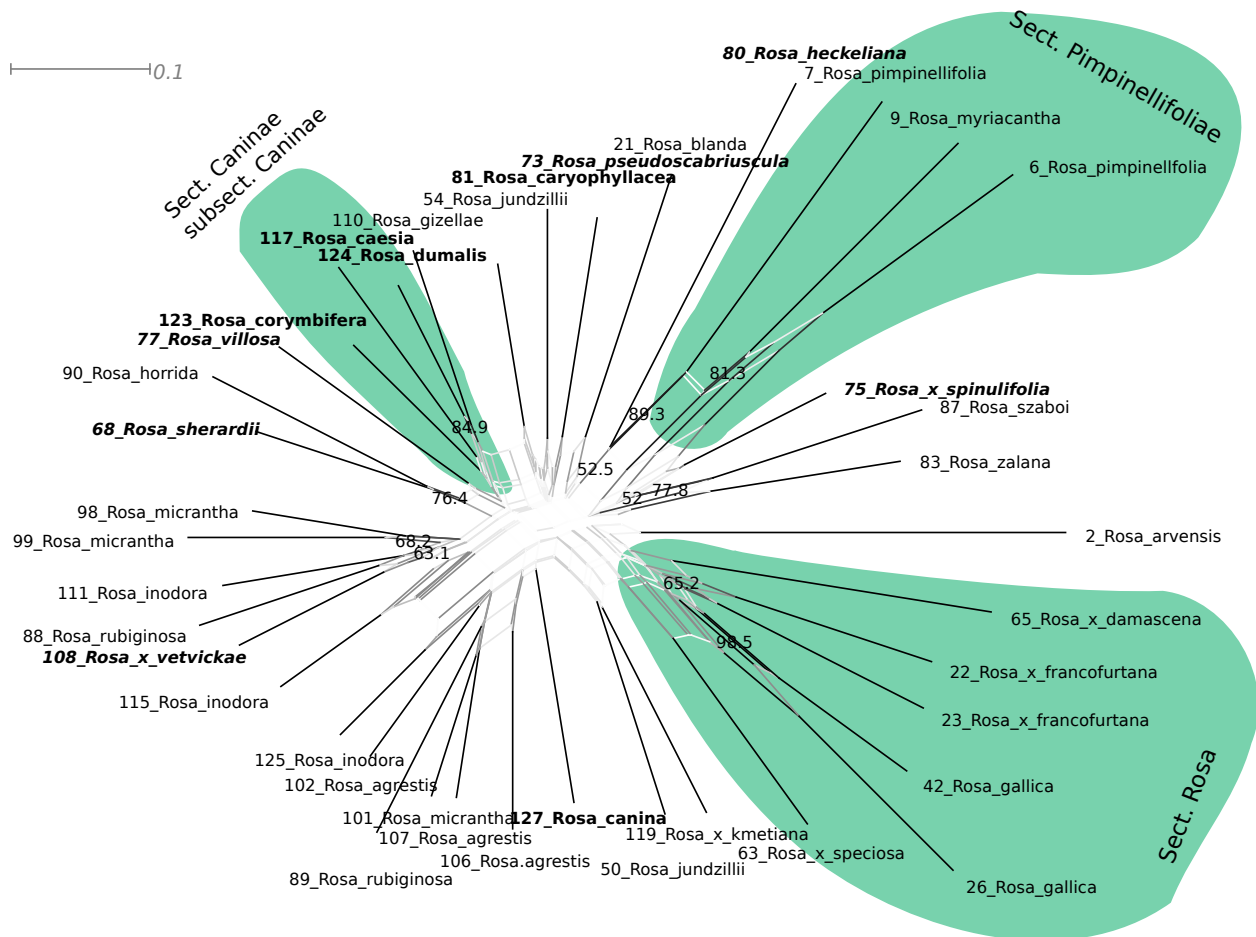


(g) *R. x kmetiana* (119) generatív hajtása és virágjának morfológiája

17. ábra: A *Rubigineae* alszekciót képviselő egyes vizsgált egyedek. A zárójelben feltüntetett mintagyűjtési számok alapján az adott egyedről további információ található a 3. és 11. táblázatokban. (Fotók: Udvardy László [a,f,g] és Deák Tamás [b,c,d,e])

5.1.1. Filogenetikai megközelítés

Az AFLP adatok fenetikai alapú értékelése mellett filogenetikai szempontból is elemeztem a vizsgált mintákat. A dice index alapján számított neighbor-net hálózatot mutatja a 18. ábra.

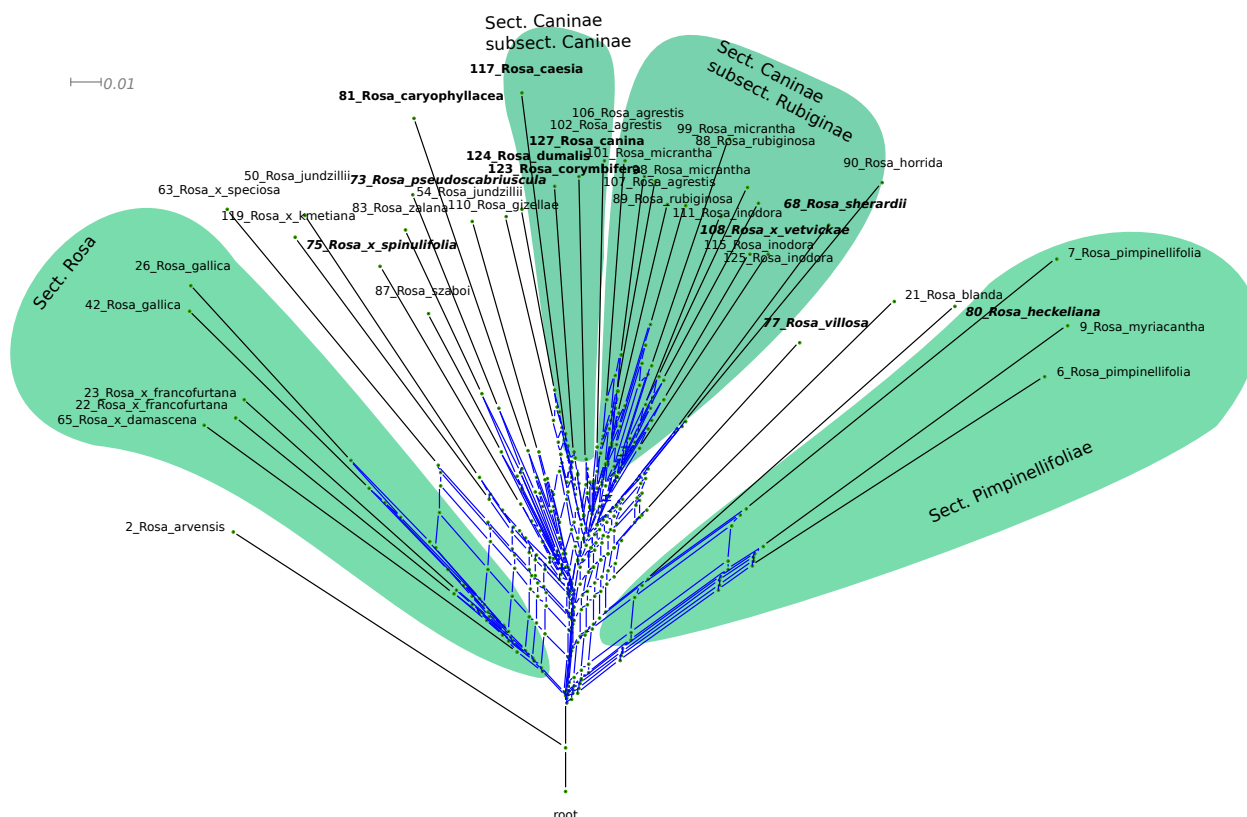


18. ábra: A vizsgált rózsa taxonok neighbor-net filogenetikai hálózata. Az élk színének erőssége a megbízhatósággal növekszik, az 50 % fölötti bootstrap támogatottságot az élre írt értékek jelölik. A *Caninae* szekció *Caninae* alszekciójának fajait vastagon, a *Vestitae* alszekció tagjait vastagon és dőlten szedett betűk jelzik.

A *Pimpinellifoliae* és a *Rosa* szekciók a fenogramokhoz hasonlóan jól elkülönülnek a fán 80 % fölötti bootstrap támogatottsággal. Bár a *Caninae* szekció *Caninae* alszekciójának egyes fajai ([123] *R. corymbifera*, [124] *R. dumalis* és [117] *R. caesia*) közös kládon találhatóak, a további *Caninae* alszekcióba tartozó két taxon ([81] *R. caryophyllacea* és [127] *R. canina*) teljesen eltérő kládon helyezkednek el. A fa alapján *Vestitae* alszekció ugyanúgy polifiletikus jellegű, mint ahogyan az a fenogramon megjelent.

Általánosságban elmondható, hogy azok a taxonok, amelyek a fenogramon (15. ábra) és annak fahálózatán (16. ábra) egyaránt hibrid eredetűnek bizonyultak, a neighbor-net fán ugyanúgy

elszórtnan helyezkednek el. A neighbor-net hálózat mindazonáltal – még ha filogenetikai alapokon is – csupán az adatokban rejlő hálózatos szerkezetet mutatja meg.



19. ábra: A vizsgált rózsaxonok hibridizáció alapuló evolúciós modell alapján felállított evolúciós hálózata. A *Caninae* szekció *Caninae* alszekciójának tagjait vastagon, a *Vestitae* alszekció tagjait vastagon és dőlten szedett betűk jelzik.

A „reticulate network” (hibridizációs hálózat) olyan hálózat, amely kifejezetten a hibridizáció evolúcióban betöltött szerepét hivatott megjeleníteni. A hibridizációs hálózat már alkalmaz evolúciós modellt a fa felépítéséhez. Az AFLP adatok alapján felállított hibridizációs hálózaton (19. ábra) a *Pimpinellifoliae* és a *Rosa* szekciók határozott elkülönülése mellett valamelyes „javulást” mutat a *Caninae* szubszekció, amely ezen elemzés alapján monofiletikus. A korábbi elemzésekhez képest szintén javult a *Trachyphyllae* alszekció ([50] *R. jundzillii*, [54] *R. jundzillii* és [63] *R. × speciosa*) helyzete is, ám azok továbbra sem alkotnak egységes kládot.

A *Vestitae* szekciót képviselő taxonok továbbra is elszórtnan helyezkednek el a filogramon, a hibrid eredetű csoportok nem jelentkezik olyan egyértelműen, mint a fenetikai fák hálózata (16. ábra).

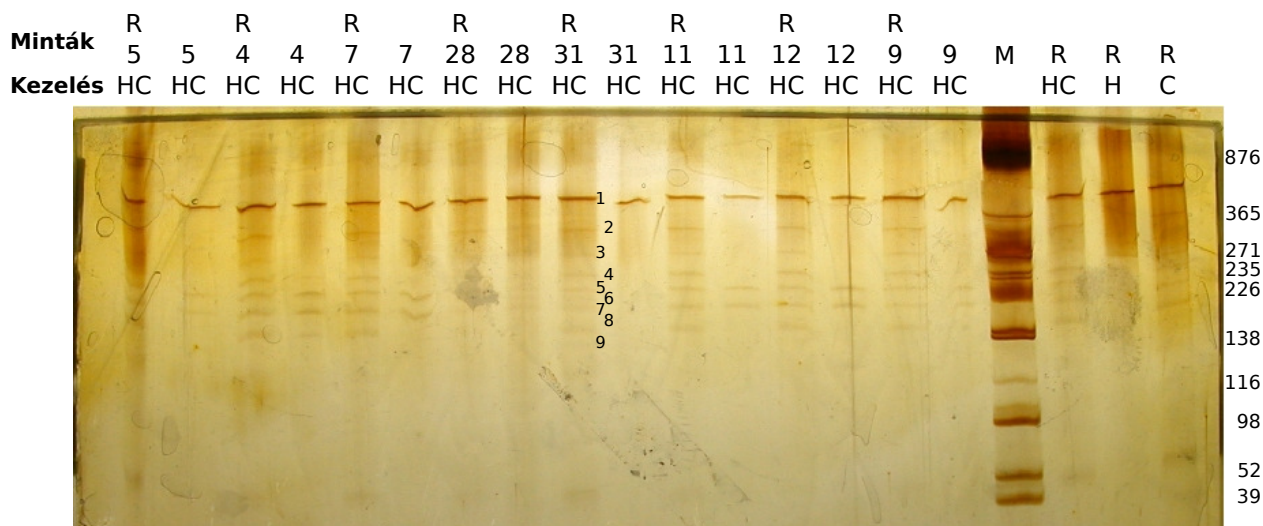
A fenetikai elemzésekben egymástól elkülönülten jelentkező két *R. francofurtana* taxon (22 és 23) a filogenetikai megközelítés alapján közös eredetet mutat. Ugyanez a jelenség tapasztalható a *R. micrantha* (98, 99, 101) és *R. agrestis* (102, 106, 107) taxonok esetében, illetve egyes hibrid taxonok

kivételével ([119] *R. kmetiana*, [87] *R. zalana* és [83] *R. szabói*) monofiletikusnak bizonyult a *Rubigineae* alszekció.

A filogenetikai megközelítés – ezen belül is elsősorban a hibridizációs hálózat – képes volt tehát feloldani számos olyan leszármazási vonalat, amelyeket a fenetikai elemzés nem tudott kezelni (*Rubigineae* és *Caninae* alszekciók), ugyanakkor a fenetikai megközelítés, ill. a bootstrap mintavételezésből számított UPGMA fák hálózati konszenzusa rendkívül jól kiemelte azokat a taxonokat, amelyek hibrid eredetűek.

5.2. A *Pimpinellifoliae* szekció *CelI* polimorfizmusa

Az AFLP polimorfizmus vizsgálata mellett terveztük a nemzetség ITS alapú vizsgálatát is. RITZ és mts. (2005) átfogó ITS alapú munkájában csak a *Caninae* és *Rosa* szekciók képviselőinek ITS szakaszait klónozták, míg a többi szekció esetében direkt-szekvenálást alkalmazott, bár a rózsák ezen szekcióinak ITS-polimorfizmusáról nincsen közvetlen információnk. A *Pimpinellifoliae* ITS-polimorfizmusának felmérése érdekében a felszaporított nrITS1 régiót *CelI* enzimmal emésztettük.



20. ábra: A *Pimpinellifoliae* szekció nrITS1 szekvenciáinak polimorfizmusa. A gélen egymás mellett található páronként a vizsgált minta és a referencia 1:1 arányú elegyének polimorfizmusa, majd az adott egyed belső polimorfizmusa. Minták: R – referencia minta, mintazonosító – a 4. táblázatban található mintagyűjtési sorszámok, M – Méretmarker: *TruI* enzimmal emésztett pKS plazmid DNS; Kezelések: HC – heteroduplex-képzés és *CelI* emésztés; H – heteroduplex-képzés; C – *CelI* emésztés. A gélen a markerek sorszáma került feltüntetésre. (A méretmarker csupán tájékoztató jellegű. Az emésztés feltehetőleg nem volt teljes, nem csupán a várt fragmentumok, hanem azok különböző kombinációi is megjelentek a képen.)

A *CeII* polimorfizmus kimutatására irányuló kísérletek során a mintakészletben a *Pimpinellifoliae* szekció fajait, továbbá kontrollként a *Rosa* szekció két *R. gallica* taxonját vizsgáltam, így az tartalmazott a rózsanemzetség eltérő szekcióiba tartozó taxonokat, másrészt egyetlen fajnak különböző, egymáshoz igen közelálló változatait is. Az ITS régiók PCR-rel való felszaporítása után a szakaszokat kétféleképpen értékeltem. Vizsgáltam egyrészt a belső polimorfizmust, másrészt egy referenciamintát adtam a mintákhoz, és az így kapott heteroduplexet emésztettem *CeII* enzimmal. Az emésztett, majd denaturáló poliakrilamid gélen elválasztott fragmenseket a 20. ábra mutatja.

A kontroll minta önmagával képzett heteroduplexe (H) nem mutatott polimorfizmust, ez alapján a gélen látható diszkrét sávok a *CeII* emésztés, azaz mismatch-ek kialakulásának eredményei. A kontroll minta heteroduplex képzését követő *CeII* polimorfizmus (HC) egyezett a heteroduplexképzés nélküli *CeII* polimorfizmussal (C). Ennek oka lehet, hogy a PCR amplifikáció hőciklusai során már kialakultak heteroduplexek, melyeket az enzim emésztett. Ezt a jelenséget – a heterozigóta lókuszok PCR amplifikációja során tapasztalható spontán heteroduplex képzését – a csemegezőlő magvatlatlanság nyomonkövetésére kifejlesztett SCAR-RFLP markerek esetében is megfigyeltem.

Az AFLP adatok kiértékelésének lépéseéhez hasonlóan bináris adatmátrixot készítettem (6. táblázat). Mivel a minták közötti polimorfizmus viszonylag csekélynek mutatkozott, az adatokon statisztikai értékelést nem végeztem.

6. táblázat: A *Pimpinellifoliae* szekció vizsgált egyedeinek *CeII* polimorfizmusa. 4,5,7: *R. pimpinellifolia*; 9: *R. myriacantha*; 11, 12: *R. × reversa*; 28, 31: *R. gallica* (*Rosa* szekció) (4. táblázat). A sávok sorszámának megfelelő markerek a 20. ábrán láthatók.

Sáv No.	R 5	R 5	R 4	R 4	R 7	R 7	R 28	R 28	R 31	R 31	R 11	R 11	R 12	R 12	R 9	R 9	R –
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
3	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
4	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
6	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
8	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1
9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

A 6. táblázatból kiolvasható, hogy a referenciaminta belső polimorfizmusa volt a vizsgált minták között a legnagyobb. Ennek oka, hogy az egyes minták ITS polimorfizmusáról nem rendelkezünk előzetes információval. A tapasztalt nagy polimorfizmus nem teszi lehetővé a nyolc mintának a referenciamintához, és ezen keresztül egymáshoz való hasonlítását, mivel azok különbözőségeit a referenciaként használt minta belső polimorfizmusa elfedi.

A vizsgált nyolc rózsaminta közül a *R. pimpinellifolia* egyes változatainak ([5] *R. pimpinellifolia* var. *pimpinellifolia*, [4] *R. pimpinellifolia* var. *spinosissima*, [7] *R. pimpinellifolia* var. *spinosissima* és [9] *R. myriacantha*) DNS-ujjlenyomata egyetlen lókusz (8. lókusz) kivételével teljesen meg-

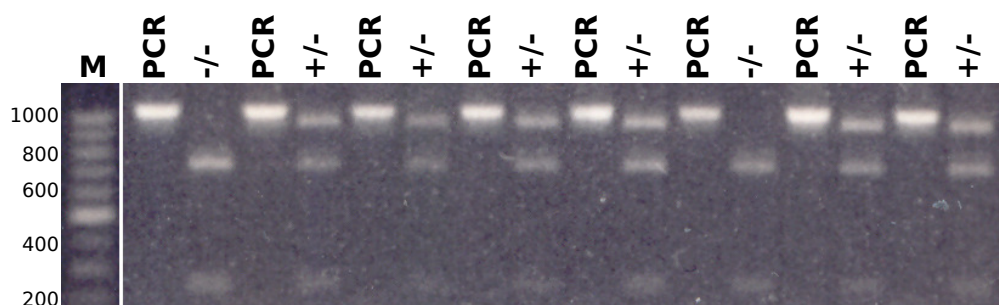
egyezett. A *R. × reversa* hibridtaxon két mintája ([11] *R. × reversa* nm. *holikensis* és [12] *R. × reversa*) szintén teljes egyezést mutatott. Ugyanakkor ez utóbbi két taxon hibrid eredetű, és egyik feltételezett szülője éppen a legnagyobb mintaszámmal képviselt *R. pimpinellifolia* alakkör, így a két típus nagyfokú egyezése természetesnek tekinthető. A további két vizsgált *R. gallica* egyed ([28] *R. gallica* var. *austriaca* és [31] *R. gallica* var. *virescens*) esetében a technikai kivitelezés nem volt tökéletes, ami nagyban megnehezíti a kapott eredmények értelmezését és a gél leolvasást. A *Rosa* szekcióhoz tartozó ezen két mintánál egyértelműen megjelennek olyan sávok, amelyek a *Pimpinellifoliae* szekcióból származó mintákra nem voltak jellemzőek (3. és 6. lókuszt).

5.3. Szőlő-magvatlanság követése SCAR-CAPS markerrel

5.3.1. SI és TII hibridcsaládok

Az SZ. NAGY LÁSZLÓ által végzett keresztezésekből származó TII és SI hasadó nemzedékekben az SCC8 SCAR-CAPS marker kiválóan követte a vizsgált egyedek fenotípusát: a marker alapján magvatlan növények valóban nem, vagy csak fejletlen maggal rendelkeztek, míg a marker alapján magvasnak mutató növények valóban magvasak voltak.

Az SI családban a 27 vizsgált egyed 33 %-ánál a PCR reakcióban nem kaptam amplifikációt az SCC8 primerekkel. Ezek az egyedek kivétel nélkül magvas fenotípusúak voltak (7. táblázat). A CSÉT164 *scc8*⁻/?, a 'Flame seedless' fajta *SCC8*⁺/? genotípusának bizonyult.



21. ábra: A T II hibridcsalád egyedei magvatlanság genotípusának azonosítása SCAR-CAPS markerrel. +/-: heterozigóta (*SCC8*⁺/*scc8*⁻, magvatlan), -/-: homozigóta recesszív (*scc8*⁻/*scc8*⁻, magvas), M: Fermentas GeneRuler™ 100 bp méretmarker.

A TII hibridcsalád vizsgálatánál az első vizsgálati évben a populáció egyedeinek 33 %-a magvas, 33 %-a magvatlan fenotípust mutatott, amely fenotípusnak megfelelt az egyedek SCC8 SCAR-CAPS marker genotípusa. Az egyedek további 34 %-ában a vizsgálat csak a következő évben volt összevethető a markeres eredménnyel, mivel ezek az egyedek még nem fordultak termőre. A következő évben további 6 % magvatlan és 8 % magvas növényt kaptunk (21. ábra, 7. táblázat).

5. Eredmények

7. táblázat: Az SI és TII hibridsaládok *SCC8* genotípusa és magvatlanság fenotípusa. **(A)** A markerezés eredményeként kapott *SCC8* genotípusok és a vizsgált egyedek sztenospermokarp magvatlanság fenotípusa. **(B)** A szülők pontos *SCC8* genotípusától függő hasadási arányok illeszkedése az elméleti arányokhoz (zárójelben), az illeszkedés χ^2 -értéke.

A					
SI			TII		
Egyed	<i>SCC8</i> genotípus	Magvatlanság fenotípus	Egyed	<i>SCC8</i> genotípus	Magvatlanság fenotípus
SI/10	<i>SCC8</i> ⁺ /0	magvatlan	TII/40	<i>SCC8</i> ⁺ / <i>scc8</i> ⁻	magvatlan
SI/11	<i>SCC8</i> ⁺ / <i>scc8</i> ⁻	magvatlan	TII/44	<i>scc8</i> ⁻ /?	magvas
SI/12	<i>scc8</i> ⁻ /0	magvas	TII/46	<i>scc8</i> ⁻ /?	magvas
SI/13	<i>SCC8</i> ⁺ / <i>scc8</i> ⁻	magvatlan	TII/49	<i>scc8</i> ⁻ /?	magvas
SI/14	0/0	magvas	TII/50		
SI/15	<i>SCC8</i> ⁺ / <i>scc8</i> ⁻	magvatlan	TII/51	<i>scc8</i> ⁻ /?	magvas
SI/17	<i>SCC8</i> ⁺ / <i>scc8</i> ⁻	magvatlan	TII/53	<i>SCC8</i> ⁺ / <i>scc8</i> ⁻	magvatlan
SI/18	0/0	magvas	TII/54	<i>SCC8</i> ⁺ / <i>scc8</i> ⁻	magvatlan
SI/19	0/0	magvas	TII/55	<i>SCC8</i> ⁺ / <i>scc8</i> ⁻	magvatlan
SI/20	0/0	magvas	TII/58	<i>SCC8</i> ⁺ / <i>scc8</i> ⁻	magvatlan
SI/21	<i>SCC8</i> ⁺ / <i>scc8</i> ⁻	magvatlan	TII/59	<i>scc8</i> ⁻ /?	magvas
SI/22	<i>scc8</i> ⁻ /0	magvas	TII/61	<i>SCC8</i> ⁺ / <i>scc8</i> ⁻	magvatlan
SI/23	0/0	magvas	TII/62	<i>SCC8</i> ⁺ / <i>scc8</i> ⁻	magvatlan
SI/24	0/0	magvas	TII/63		
SI/25	<i>SCC8</i> ⁺ /0	magvatlan	TII/66	<i>scc8</i> ⁻ /?	magvas
SI/26	<i>SCC8</i> ⁺ / <i>scc8</i> ⁻	magvatlan	TII/67	<i>SCC8</i> ⁺ / <i>scc8</i> ⁻	magvatlan
SI/27	<i>scc8</i> ⁻ /0	magvas	TII/68	<i>scc8</i> ⁻ /?	magvas
SI/29	0/0	magvas	TII/69	<i>scc8</i> ⁻ /?	magvas
SI/30	<i>scc8</i> ⁻ /0	magvas	TII/70	<i>SCC8</i> ⁺ / <i>scc8</i> ⁻	magvatlan
SI/31	<i>scc8</i> ⁻ /0	magvas	TII/71	<i>scc8</i> ⁻ /?	magvas
SI/32	<i>SCC8</i> ⁺ / <i>scc8</i> ⁻	magvatlan	TII/72	<i>SCC8</i> ⁺ /?	magvatlan
SI/33	<i>scc8</i> ⁻ /0	magvas	TII/73	<i>scc8</i> ⁻ /?	magvas
SI/34	<i>scc8</i> ⁻ /0	magvas	TII/74	<i>SCC8</i> ⁺ /?	magvatlan
SI/35	0/0	magvas	TII/75	<i>SCC8</i> ⁺ /?	magvatlan
SI/36	0/0	magvas	TII/76	<i>SCC8</i> ⁺ / <i>scc8</i> ⁻	magvatlan
SI/37	<i>scc8</i> ⁻ /0	magvas	TII/77	<i>scc8</i> ⁻ /?	magvas
SI/38	<i>SCC8</i> ⁺ / <i>scc8</i> ⁻	magvatlan	TII/78	<i>scc8</i> ⁻ /?	magvas
			TII/80	<i>SCC8</i> ⁺ / <i>scc8</i> ⁻	magvatlan

B					
SI			TII		
Hasadás	<i>SCC8</i> genotípus	χ^2	Hasadás	<i>SCC8</i> genotípus	χ^2
8 (1)	<i>SCC8</i> ⁺ / <i>scc8</i> ⁻	5,0741 ^a	11 (1)	<i>SCC8</i> ⁺ / <i>scc8</i> ⁻	10,7143 ^a
2 (1)	<i>SCC8</i> ⁺ /0		3 (1)	<i>SCC8</i> ⁺ /0	
8 (1)	<i>scc8</i> ⁻ /0		12 (1)	<i>scc8</i> ⁻ /0	
9 (1)	0/0		2(1)	0/0	
			12 (2)	<i>scc8</i> ⁻ /?	5,0769 ^b
			11 (1)	<i>SCC8</i> ⁺ / <i>scc8</i> ⁻	
			3 (1)	<i>SCC8</i> ⁺ /0	
			11 (1)	<i>SCC8</i> ⁺ / <i>scc8</i> ⁻	0,0435 ^c
			12 (1)	<i>scc8</i> ⁻ / <i>scc8</i> ⁻	

^a Szülők genotípusa, keresztezés: *SCC8*⁺/0 × *scc8*⁻/0.

^b Szülők genotípusa, keresztezés: *SCC8*⁺/*scc8*⁻ × *scc8*⁻/0. Ehhez a hasadási arányhoz feltételeznünk kell, hogy a PCR termék hiányát nem null-allélok, hanem technikai probléma okozza.

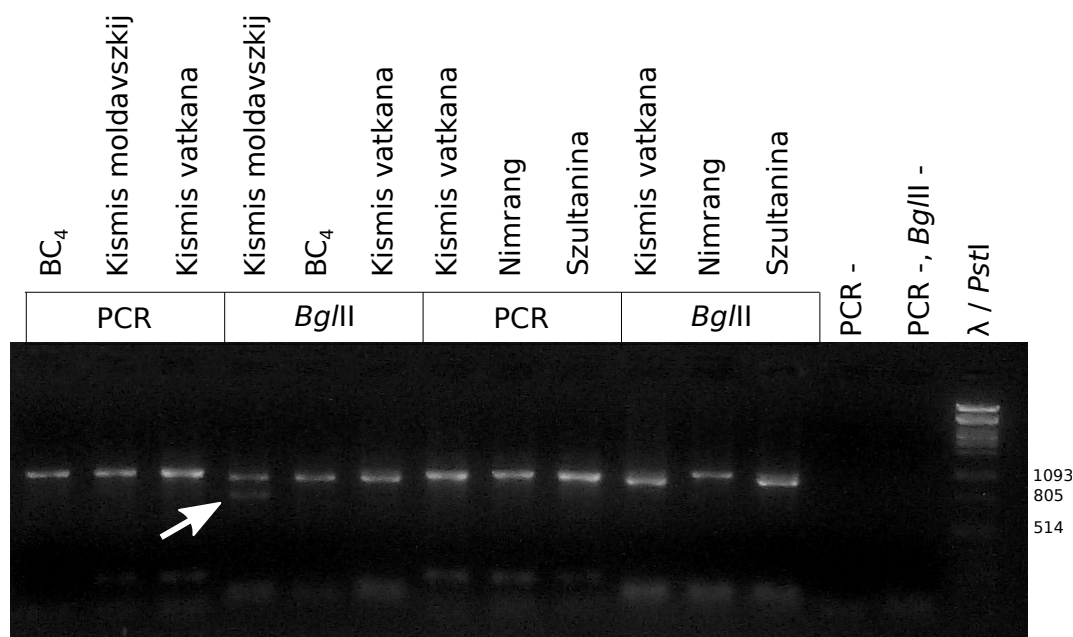
^c Szülők genotípusa, keresztezés: *SCC8*⁺/*scc8*⁻ × *scc8*⁻/*scc8*⁻. Ennél a hasadási aránynál a 0/0 marker-genotípus mellett az *SCC8*⁺/? genotípus is „mérési hibának” tekintendő.

Az *SdI* lókuszra nézve heterozigóta (magvatlan apa) és recesszív homozigóta (magvas anya) keresztezéséből kapott hasadási arány megfelel a várákozásnak. A magvatlan utódok között azonban a molekuláris markerek homozigóta magvatlan utódokat is kimutattak (7. táblázat). Ennek egyik lehetséges magyarázata egy feltételezett null-allél jelenléte az anya vonalban a TII család esetében, illetve az anya- és apa-vonalakban egyaránt az SI család esetében.

5.3.2. VRH 3082-1-42 (BC₄) × 'Kismis moldavszkij család magvatlansága

A jelenleg a Pécsi Tudományegyetemhez tartozó Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet multirezisztens, magvatlan csemege-szőlő nemesítési programjában ifj. KOZMA PÁL a borszőlő-nemesítés anyagaiból kiindulva *Vitis rotundifolia* negyedik visszakereszteléséből származó egyedet használ rezisztencia-forrásként.

A programban részt vevő szülők *SCC8* genotípusáról nem rendelkezünk előzetes információval, ezért megvizsgáltam a keresztezésekben leggyakrabban használt fajták (BC₄ rezisztenciaforrás, valamint 'Kismis vatkana', 'Kismis moldavszkij' magvatlanságforrások és a 'Nimrang' fajta) *SCC8* genotípusát (22. ábra).



22. ábra: A Pécsi Szőlészeti és Borászati Kutatóintézet multirezisztens magvatlan csemege-szőlő nemesítési programjában leggyakrabban használt szülők *SCC8* genotípusa. A nyíl a magvassághoz kapcsolt allél hasítási termékét mutatja.

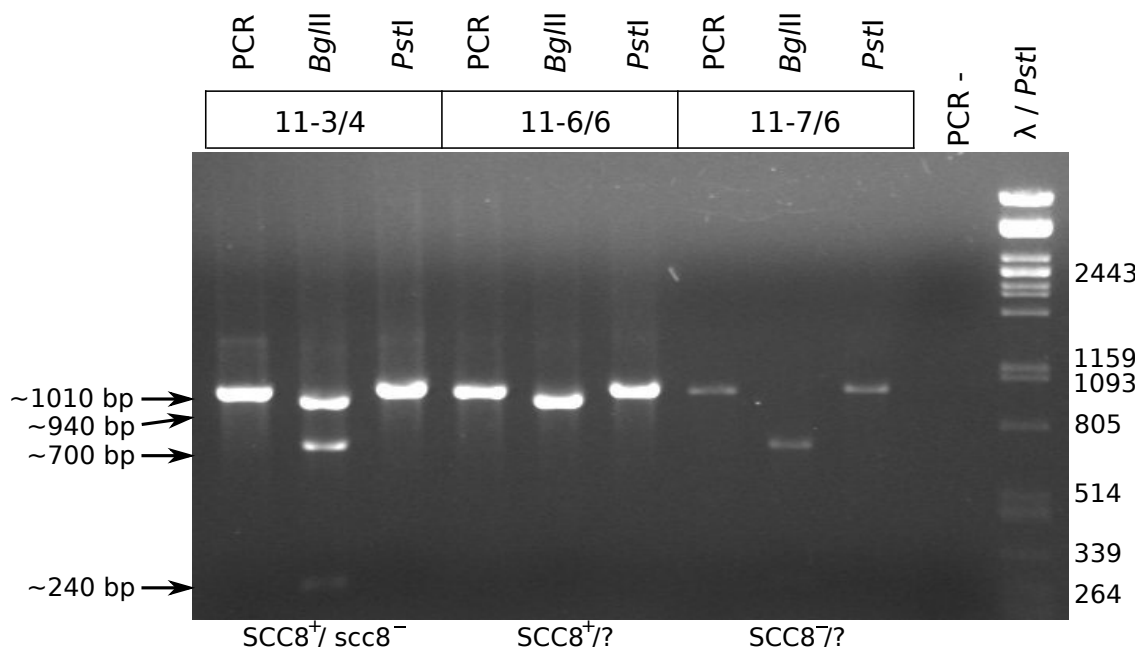
A kontrollként használt, az *SdI* lókuszra domináns homozigóta 'Sultanina' (syn. 'Thompson Seedless') fajta az irodalomból ismert *SCC8*⁺/*SCC8*⁺ genotípust mutatta. Szintén domináns

homozigótának bizonyult a 'Kismis vatkana' fajta, ez esetben azonban nem zárható ki a lehetőség, hogy a fajta a domináns $SCC8^+$ allél mellett egy null allélt hordoz.

A 'Nimrang' fajta esetében a PCR terméket nem hasította a *Bgl*III enzim a magvassághoz kapcsolt hasítóhelyen. Mivel azonban a PCR-termék többi fajtánál tapasztalható méretcsökkenését – amelyet a *Bgl*III enzim $SCC8^+$ és $scc8^-$ allélokra egyaránt jellemző, a 73. nukleotid-pozícióban történő hasítása eredményez – nem figyeltem meg, feltételezem, hogy a PCR termék nem a megfelelő lókusztól származik (5.4. fejezet). Ezt a feltételezést alátámasztja az is, hogy a 'Nimrang' fajtánál csak 50 °C primerkötési hőmérséklet alkalmazásával kaptam PCR terméket, szemben az egyéb kísérletekben használt 60 °C-kal.

A vizsgált magvatlan fajták közül a 'Kismis moldavszkij' volt az egyetlen, amely heterozigótának bizonyult az $SCC8$ lókuszt $SCC8^+/scc8^-$ genotípussal. A BC₄ csak a lókuszt domináns allélját mutatta.

Mivel a BC₄ magvas típus, $SCC8$ mintázata alapján mégis magvatlan képet mutat – azaz a fajta vagy a hasítóhelyre mutáns, vagy rekombináns $SCC8$ allélt hordoz –, a BC₄ keresztezésekben a marker használata korlátozott. Csak azokban a keresztezésekben használható érdemben a marker, ahol a magvatlanságot hozó apai szülővonal a markerre nézve is heterozigóta. Ezek alapján kezdtük el vizsgálni a BC₄ × 'Kismis moldavszkij' családot.



23. ábra: A magvatlanság markerezése során a BC₄ × 'Kismis moldavszkij' családban tapasztalt gélmintázatok jellegzetes példái. PCR: PCR termék emésztés nélkül; *Bgl*III és *Pst*I: emésztett PCR termék; PCR-: PCR negatív kontroll; Méretmarker: *Pst*I-emésztett λ fág DNS.

A $BC_4 \times$ 'Kismis moldavszkij' családban megfigyelt gélmintázat-típusokat mutatja a 23. ábra. Az $SCC8^+/scc8^-$ heterozigóták (pl. 11-3/4) és az $SCC8^+/?$ „homozigóták” (pl. 11-6/6) mellett a család vizsgálata (9. táblázat) során 13 esetben tapasztaltam azt, hogy a marker csak a magvasságért felelős *sdI* allélhoz kapcsolt $scc8^-$ allélt mutatta (pl. 11-7/6, 23. ábra). Mivel ezek az egyedek a család vizsgált egyedeinek 17 %-át adták és a fenotipizálás során kivétel nélkül magvasnak bizonyultak, feltételeztem, hogy a BC_4 hordoz egy null-allélt.

A fentiek ismeretében – azaz egy „rekombináns” és egy null allélt feltételezve a BC_4 szülőben – felállítottam egy feltételezett Punett-táblát (24. ábra). A sztenospermokarp magvatlanság szempontjából heterozigóta 'Kismis moldavszkij' $SCC8^+$ és $scc8^-$ alléljai mellett a keresztezésben a BC_4 rekombináns ($SCC8^+[R]$) és null alléljai játszanak szerepet. A 24. ábrán felrajzolt Punett-tábla alapján 2:1:1 arányban kell kapnunk $SCC8^+/?$ ($SCC8^+[R]/SCC8^+$ és $SCC8^+/0$), $SCC8^+/scc8^-$ és $scc8^-/0$ genotípusú egyedeket.

A $BC_4 \times$ 'Kismis moldavszkij' nemzedékben a magvatlanság 1:1 arányban, az $SCC8$ lokusz pedig – a felállított Punett-táblának (24. ábra) megfelelően – 2:1:1 arányban öröklődött. Mindkét hasadási arányt támogatja a χ^2 próba (8. táblázat). A $BC_4 \times$ 'Kismis moldavszkij' családban megfigyelt magvatlanság- és marker-hasadási arány alátámasztja tehát a „rekombináns” és a null-allél jelenlétét a BC_4 esetében.

8. táblázat: A sztenospermokarp magvatlanság hasadási aránya, valamint az $SCC8$ lokuszon megfigyelt genotípusok aránya (9. táblázat) a $BC_4 \times$ 'Kismis moldavszkij' nemzedékben.

	Magvatlan		Magvas		Összesen	Eloszlás	χ^2
	$SCC8^+(R)/SCC8^+$	$SCC8^+/0$	$SCC8^+/scc8^-$	$scc8^-/0$			
Fenotípus	44		34		78	1:1	1,282
Genotípus	44		18	13	75	2:1:1	2,919

	KM $SCC8^+$	KM $scc8^-$
BC_4 $SCC8^+(R)$	$SCC8^+(R)/SCC8^+$ 	$SCC8^+(R)/scc8^-$
BC_4 0	$SCC8^+/0$ 	$scc8^-/0$

24. ábra: Az $SCC8$ lokusz öröklődésének Punett-táblája a $BC_4 \times$ 'Kismis moldavszkij' hibridnemzedékben. KM: 'Kismis moldavszkij', $SCC8^+(R)$: a BC_4 feltételezett rekombináns, vagy a *Bg*/II hasítóhelyben mutálódott allélja, 0: A BC_4 feltételezett null allélja. A gélrészleteken bal oldalon a PCR termék, mellette a *Bg*/II hasítás eredménye látható.

9. táblázat: Magvatlanság a BC₄ × 'Kismis moldavszkij' családban. Az *SCC8*^{+/?} genotípus az *SCC8*^{+/SCC8}(R) és *SCC8*^{+/0} genotípusoknak (24. ábra) felel meg.

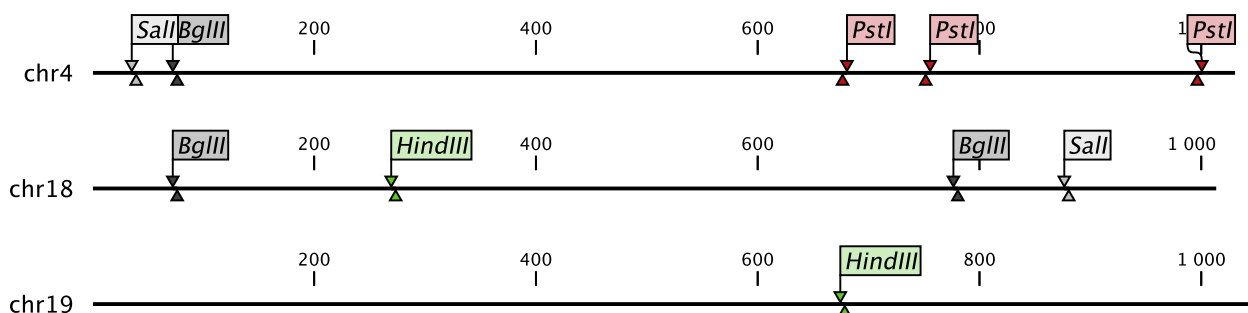
Egyed	<i>SCC8</i> genotípus	Mag fenotípusa	Egyed	<i>SCC8</i> genotípus	Mag fenotípusa	Egyed	<i>SCC8</i> genotípus	Mag fenotípusa
10-4/4	<i>SCC8</i> ^{+/scc8} ⁻	kemény mag	11-10/2	<i>scc8</i> ⁻ /0	kemény	12-12/3	<i>scc8</i> ⁻ /0	kemény
10-5/4	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha, nagy	11-11/2	n.a.	kemény	12-13/1	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha apró
10-8/3	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha	11-12/2	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha kicsi-nagy	13-1/6	<i>SCC8</i> ^{+/scc8} ⁻	kemény
10-8/6	<i>SCC8</i> ^{+/scc8} ⁻	kemény	12-1/2	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha kicsi	13-2/1	n. a.	kemény
10-10/2	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha, kicsi	12-1/3	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha kicsi	13-2/2	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha közepes
10-11/6	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha, apró	12-1/6	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha apró	13-2/3	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha apró
11-1/4	<i>SCC8</i> ^{+/scc8} ⁻	kemény	12-2/2	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha közepes	13-3/1	<i>SCC8</i> ^{+/scc8} ⁻	kemény
11-1/5	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha, közepes	12-4/3	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha közepes	13-3/2	<i>SCC8</i> ^{+/scc8} ⁻	kemény
11-2/2	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha, közepes	12-4/6	<i>SCC8</i> ^{+/scc8} ⁻	kemény	13-3/4	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha nagy
11-2/4	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha, közepes	12-5/3	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha közepes	13-3/6	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha közepes
11-3/1	<i>scc8</i> ⁻ /0	kemény	12-5/4	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha kicsi	13-4/1	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha közepes
11-3/4	<i>SCC8</i> ^{+/scc8} ⁻	kemény	12-6/1	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha közepes	13-4/3	<i>SCC8</i> ^{+/scc8} ⁻	kemény
11-4/2	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha, közepes	12-6/5	<i>scc8</i> ⁻ /0	kemény	13-4/5	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha apró
11-4/3	<i>scc8</i> ⁻ /0	kemény	12-6/6	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha apró	13-5/2	<i>SCC8</i> ^{+/scc8} ⁻	kemény
11-5/1	<i>SCC8</i> ^{+/scc8} ⁻	kemény	12-7/1	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha közepes	13-5/3	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha közepes
11-5/2	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha	12-7/2	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha közepes	13-5/4	<i>SCC8</i> ^{+/scc8} ⁻	kemény
11-5/6	<i>scc8</i> ⁻ /0	kemény	12-7/4	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha kicsi	13-5/5	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha kicsi
11-6/2	<i>scc8</i> ⁻ /0	kemény	12-7/6	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha közepes	13-5/6	<i>SCC8</i> ^{+/?}	kemény
11-6/6	<i>SCC8</i> ^{+/?}	nincs mag	12-8/5	<i>SCC8</i> ^{+/scc8} ⁻	kemény	13-6/1	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha apró
11-7/4	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha kicsi	12-9/1	<i>scc8</i> ⁻ /0	kemény	13-6/2	<i>SCC8</i> ^{+/scc8} ⁻	kemény
11-7/5	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha kicsi	12-9/3	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha apró	13-6/3	<i>SCC8</i> ^{+/?}	nincs mag
11-7/6	<i>scc8</i> ⁻ /0	kemény	12-10/2	<i>scc8</i> ⁻ /0	kemény	13-7/1	<i>SCC8</i> ^{+/?}	félkemény nagy
11-8/1	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha kicsi	12-10/4	<i>SCC8</i> ^{+/scc8} ⁻	kemény	13-7/2	<i>scc8</i> ⁻ /0	kemény
11-8/3	<i>SCC8</i> ^{+/scc8} ⁻	kemény	12-10/5	<i>SCC8</i> ^{+/scc8} ⁻	kemény	13-7/3	<i>SCC8</i> ^{+/scc8} ⁻	kemény
11-8/4	n.a.	kemény	12-11/1	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha apró	13-7/5	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha apró
11-9/1	<i>SCC8</i> ^{+/?}	puha kicsi	12-12/1	<i>scc8</i> ⁻ /0	kemény	13-7/6	<i>scc8</i> ⁻ /0	puha közepes

5.4. Az SCC8 lókuszt jellemzése, markerfejlesztés

Az SCC8 lókuszt alaposabb megismerése érdekében elsőként lokalizáltam azt az időközben publikált 'Pinot Noir' „homozigóta” genomon (JAILLON és mts., 2007). 15 % mismatch párosodást engedélyezve az *in silico* PCR felszaporított három lókuszt a 4., 18. és 19. kapcsoltsági csoportokról (25. ábra), amelyek mindegyike megközelítőleg 1 000 bp hosszú volt. A *Bgl*III hasítóhelyeinek helyzete alapján az SCC8 lókuszt a 18. kapcsoltsági csoporton helyezkedik el.

Ezek alapján felmerült a kérdés, vajon a BC₄ esetében tapasztalható domináns marker (SCC8⁺) a megfelelő lókusztól kerül felszaporításra, vagy esetleg a 4. vagy 19. kapcsoltsági csoportról?

A 19. kapcsoltsági csoporton található lókuszt a *Bgl*III enzim nem emészt, és mivel a BC₄ × 'Kismis moldavszkij' családban a PCR termék méretének csökkenését minden esetben tapasztaltam (23. ábra), kizártam annak a lehetőségét, hogy az SCC8 primerek a családban ezt a lókuszt felszaporítják. Ugyanakkor feltehetően ez a lókuszt kerül amplifikációra 50 °C primerkötési hőmérsékleten a 'Nimrang' fajta esetében (22. ábra).

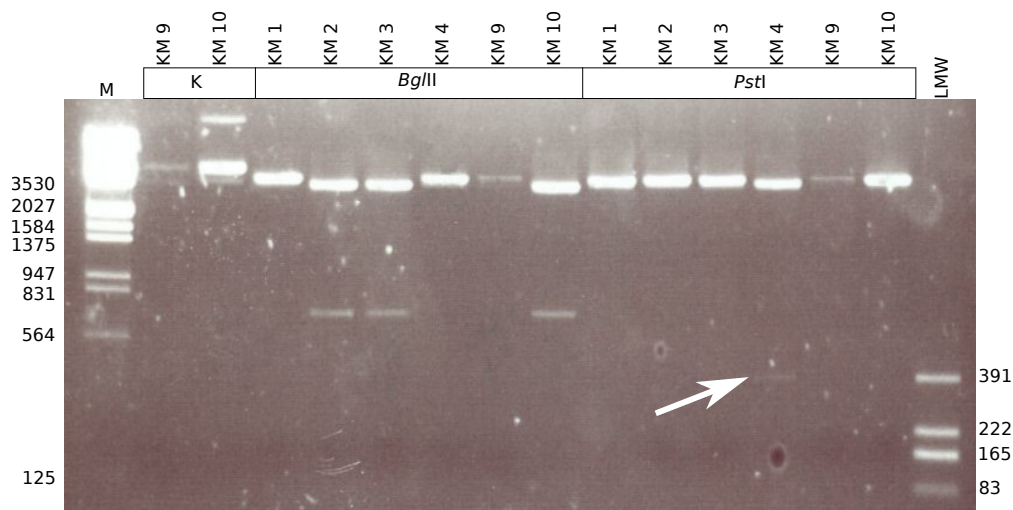


25. ábra: A 'Pinot Noir' PN40024 klón genom-szekvenciájáról SCC8 primerekkel *in silico* felszaporított lókusztok mérete és azok *Sal*I, *Bgl*III, *Pst*I és *Hind*III hasítóhelyei.

Annak ellenőrzésére, hogy a BC₄ PCR terméke a 4. vagy a 18. kapcsoltsági csoportról származik, a PCR terméket *Pst*I restrikciós endonukleázzal emésztettem. A 23. ábrán látható, hogy a *Pst*I enzim nem emésztette a PCR terméket, ezek alapján a BC₄ PCR terméke tehát a 18. kapcsoltsági csoportról származhat.

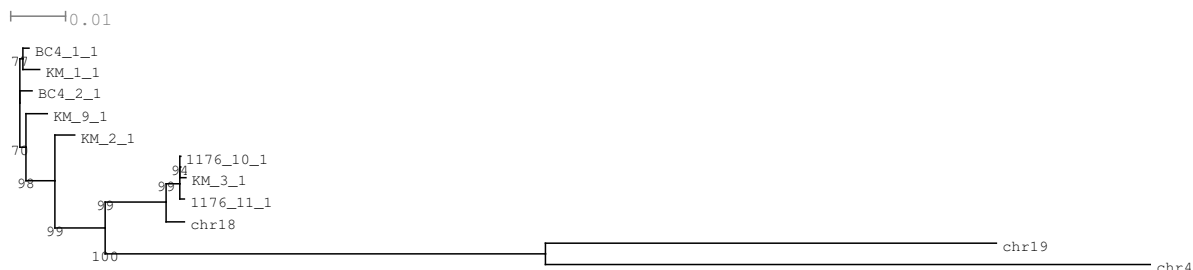
Ezek után felmerült a kérdés, mi okozza a magvatlan BC₄ alléljának domináns jellegét: pontmutáció a hasítóhelyben, vagy rekombináció? A kérdés megválaszolása érdekében meghatároztam a jellegzetes típusok SCC8 lókusztainak szekvenciáját. A 'Kismis moldavszkij' fajta PCR termékét – lévén a fajta SCC8 lókuszt nézve heterozigóta – klónoztam, egy SCC8⁺/0 és egy *scc*8⁻/0 genotípusú egyedrőtől felszaporított PCR terméket pedig direkt szekvenáltam. A direkt szekvenálás azonban nem adott értékelhető szekvenciát, ezért később ezt a két típust is klónoztam.

A 'Kismis moldavszkij' PCR termékek klónjainak kontroll *Pst*I emésztése (26. ábra) során megjelent egy olyan sáv, amely arra utal, hogy a PCR termékek populációjában – ha alacsony mértékben



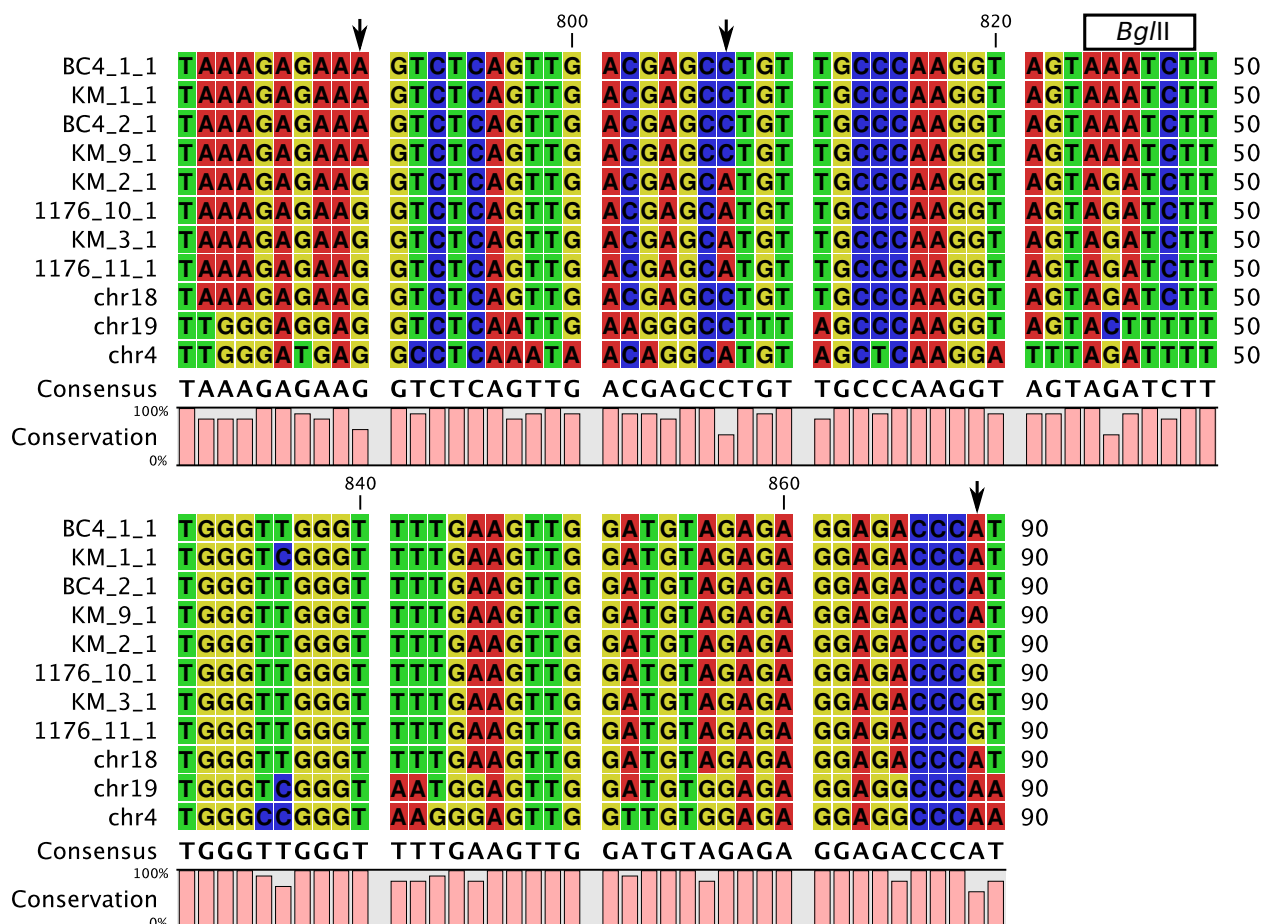
26. ábra: Ellenőrző emésztés a 'Kismis moldavszkij' *SCC8* lókuszának klónjain. A nyíl a *PstI* restrikciós termék helyzetét jelöli. M: λ fág DNS / *EcoRI*, *HindIII* méretmarker; LMW: alacsony molekulasúly marker.

is – találhatók olyan fragmensek, amelyek nem a megfelelő lókusztól kerülnek felszaporításra (jelen esetben a 4. kapcsoltsági csoportról). Ez a jelenség megmagyarázza azt is, hogy az elvileg egyetlen allélt hordozó genotípusok esetében nem bizonyult járható útnak a direkt szekvenálás.



27. ábra: A szekvenált *SCC8* lókusztok NJ fája. Az elágazáson szereplő értékek az 1 000 újrávételezésből számított százalékos bootstrap támogatottságot jelzik. KM: 'Kismis moldavszkij'; chr4, chr18, chr19: a 'Pinot noir' genomszekvenciájának 4., 18. és 19. kapcsoltsági csoportjainak *SCC8* primerekkel felszaporítható szakaszai.

A klónozott *SCC8* allélok illesztése (27. és 28. ábrák) alapján a BC₄ *SCC8* lókusza a legtöbb pontmutáció esetében a KM9 és KM2 ('Kismis moldavszkij' magvatlan alléljai) klónok pontmutációival egyezett meg, ami azt valószínűsíti, hogy a BC₄ allélja nem egyedi pontmutációt hordoz a *BglIII* hasítóhelyben, hanem rekombináns az *sdi* és *SCC8*⁺ lókusztok között. Ezt támasztja alá a szekvenált szakaszok teljes illesztése alapján rajzolt dendrogram is (27. ábra).



28. ábra: A szekvenált *SCC8* allélok illesztésének egy részlete a magvassághoz kapcsolt *Bgl*III hasítóhely körül. A nyílak a hasítóhelyen kívüli olyan nukleotid-pozíciókat jelölik, amelyek alapján megállapítható, hogy a BC₄ rekombináns az *sdl* és *SCC8*⁺ lókuszek között. A teljes illesztés megtalálható az M4.1. mellékletben.

Továbbfejlesztett *SCC8* marker

Az *SCC8* lókuszt elemzése során bebizonyosodott, hogy a LAHOGUE és mts. (1998) által közölt, az *SCC8* lókuszt felszaporításra alkalmas primerek használata esetén fennáll a lehetősége annak, hogy a primerpár a 4. és 19. kromoszómáról is felszaporít allélokat, amelyek mindazonáltal nem kapcsolnak a magvatlansághoz, így torzíthatják az eredményeket.

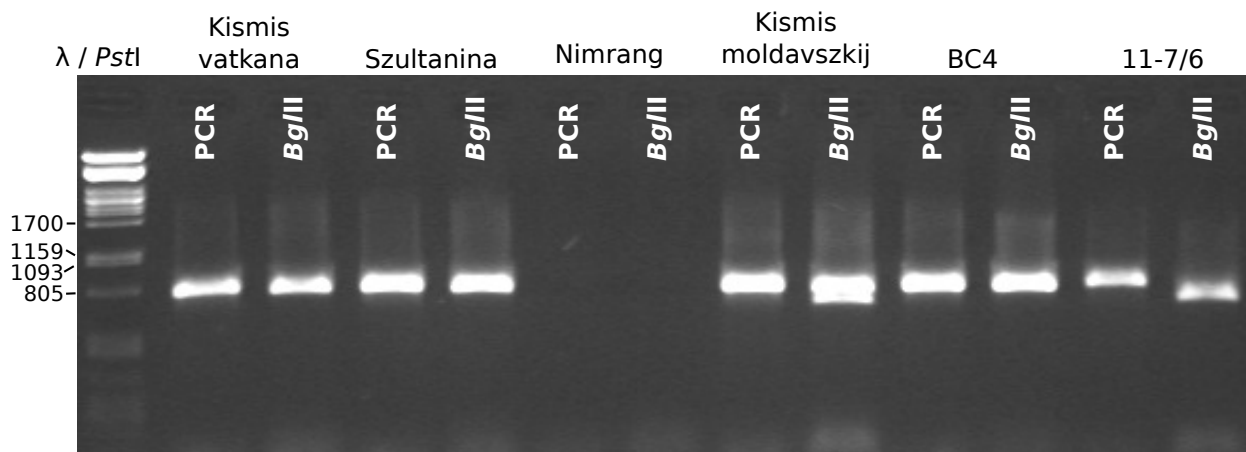
10. táblázat: Az *SCC8* lókuszt tervezett, a 4. és 19. kapcsoltsági csoportokat kizáró primerek szekvenciái.

Oligonukleotid	Szekvencia
scc-F6	5' -CAAGTTGGAAGATGGGGAGT-3'
scc-F61	5' -GCACCTGGGGAAGATCTCAT-3'
scc-R850	5' -CCAGGGGGTCTTTTAAAGTG-3'
scc-R914	5' -TCAAAAGAGGGTTGGCTCAC-3'

Ennek a lehetőségnek a kiküszöbölése érdekében új primereket terveztem (10. táblázat). Az új primerek megtervezése során az egyik legalapvetőbb szempont az volt, hogy azok ne legyenek

komplementerek a 4. és 19. kapcsoltsági csoportok *SCC8* lókuszhoz hasonló szakaszaival. Az új primerek szerepe a megbízhatóság növelése mellett annak megállapítása volt, hogy a BC₄ null allélját okozhatja-e a primerkötőhelyek pontmutációja, vagy annak oka egy nagyobb mértékű átrendeződés, különbözőség. Az előbbi esetben ugyanis – az *SCC8* lókuszok illesztése során tapasztalt nagyfokú homológia (28. ábra) alapján – a szakaszon belülre tervezett primereknek fel kellene szaporítaniuk a null allélt is.

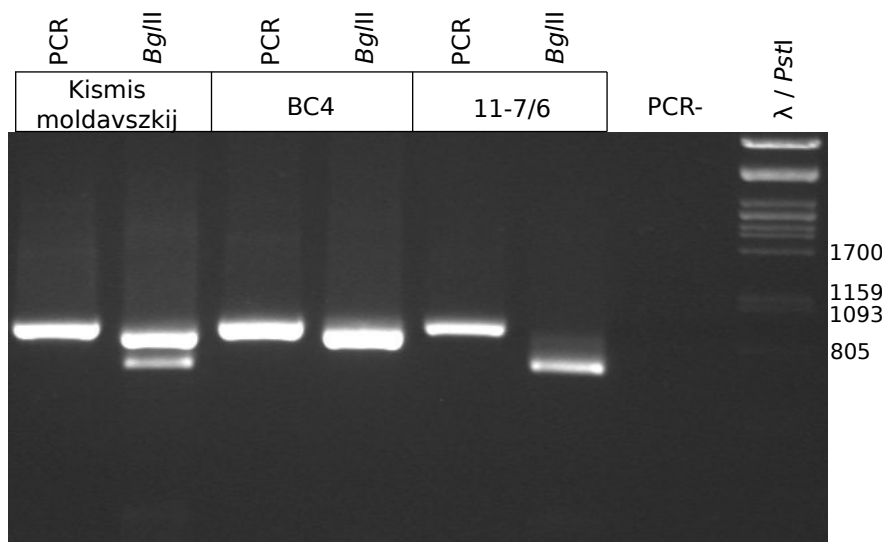
Az új primerek minden kombinációjával sikeresen amplifikáltam az *SCC8* lókuszt, a hasítási eredmények alapján a marker továbbra is alkalmazható a magvatlansáért felelős domináns *SdI* lókusz nyomonkövetésére. Azonban a primerek helyzete befolyásolja a marker kiértékelhetőségét, mivel a bal oldali primer beljebb helyezésével a PCR-termék pozitív kontrollként használható méretcsökkenése jelentkezik kevésbé markánsan a gélen, míg a jobb oldali primer beljebb helyezésével a magvassághoz kapcsolt hasítóhely termékét nehezebb detektálni (29. ábra, a hasítóhelyek elhelyezkedése a 25. ábrán látható).



29. ábra: Az scc-F61 és scc-R850 primerekkel végzett amplifikáció és emésztés eredménye különböző magvas és magvatlan genotípusokon. A marker értékelését megnehezíti, hogy az ezekkel a primerekkel felszaporított rövidebb PCR terméken kevésbé figyelhető meg a *BglII* enzimmel való emésztés után annak méretcsökkenése, illetve a magvassághoz kapcsolt hasítási termék elválása a magvas alléltól szintén kisebb mértékű. A 30. ábrához hasonlóan ennél a primerkombinációnál sem figyelhető meg új markerek megjelenése a BC₄ és egyik utóda, a 11-7/6 egyed esetében. Méretmarker: *PstI*-emésztett λ fág DNS.

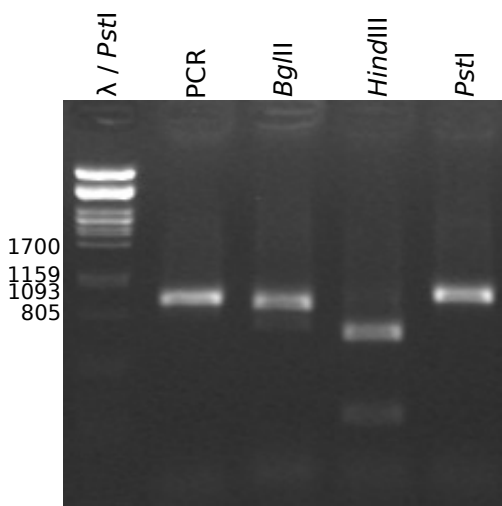
Azoknak a primereknek az esetében, amelyek a PCR-termék méretét kevésbé csökkentik (scc-F6 – scc-R914), a fent említett problémák nem állnak fent. Az elvégzett kísérletek során egyik primerkombináció esetén sem tapasztaltam olyan esetet, amikor a BC₄ null allélja megjelent volna (pl. 29. és 30. ábrák).

Mivel a különböző primerkombinációk a magvatlanság szempontjából azonos eredményt adtak, az értékelés szempontjainak figyelembevételével a jövőben az scc-F6 és scc-R914 primerek használata indokolt.



30. ábra: Szőlő-magvatlanság nyomonkövetése az *scc-F6* és *scc-R914* új SCC primerekkel. Méretmarker: *PstI*-emésztett λ fág DNS.

Annak ellenőrzése érdekében, hogy az új primerpárokkal felszaporított fragmensek valóban csak a 18. kapcsoltsági csoportról származnak, a PCR-terméket *BglII* restrikciós endonukleáz enzim mellett *HindIII* és *PstI* enzimekkel is emésztettem (31. ábra). A *PstI* hasítóhely hiánya alapján a 4. kapcsoltsági csoport kizárható, míg a *HindIII* emésztés eredménye megerősíti, hogy a termék a 18. vagy a 19. kapcsoltsági csoportról származik. A PCR-termék *BglII* emésztés hatására bekövetkező méretcsökkenése és a megjelenő hasítási termék alapján a PCR reakcióban valóban a 18. kapcsoltsági szakaszon található *SCC8* lókuszt szolgált templátként.



31. ábra: Az új primerekkel felszaporított PCR-termék *BglII*, *HindIII* és *PstI* emésztésének gélképe. Az ábra a 'Kismis moldavszkij' fajtán *scc8-F61* – *scc8-R914* primerpárral kapott eredményt mutatja. A gélkép alapján kizárható a 4. és 19. kapcsoltsági csoportok részvétele a PCR reakció során. Méretmarker: *PstI*-emésztett λ fág DNS.

6. Eredmények megvitatása

6.1. Magyarországi rózsa fajok AFLP vizsgálata

6.1.1. Előzetes megfontolások

Markerválasztás

Az AFLP technika alkalmazhatósága evolúciós vizsgálatokban megkérdőjelezhető ugyan az AFLP marker evolúciós modelljének hiánya miatt, KOOPMAN és mts. (2008) azonban éppen a rózsa nemzetséget modellként alkalmazva megmutatták, hogy a módszer filogenetikai értelmezésének van létjogosultsága. A módszerrel nagy számú, a genomon közel egyenletesen eloszló polimorf lókusztól kaphatunk információt, ami – adott szempontból – a legtöbb marker fölé helyezi. Filogenetikai vizsgálatok esetén a legelterjedtebben használt markerezési módszer a különböző intergenikus vagy intron DNS-szakaszok szekvenciájának vizsgálata, amelynek evolúciós interpretációi, modelljei jóval egzaktabbak, ám az eljárás költséges és eredményét nagyban befolyásolja a kiválasztott régió (MATSUMOTO és mts., 1998b; RITZ és mts., 2005). A megfelelő fajszintű azonosításhoz ráadásul a növények esetében nem elegendő egyetlen szekvencia vizsgálata (HOLLINGSWORTH és mts., 2009), ami tovább növeli a DNS-szekvencián alapuló megközelítés költségeit.

A mikroszatellitek – az AFLP módszerhez hasonlóan – szintén egyenletesen fedik le a genomot, ráadásul precíz, kodomináns információval szolgálnak, ám a vizsgálható lókuszok száma korlátozott. A RAPD technikával megfelelő számú oligonukleotidot felhasználva nagy számú polimorf lókusztól kaphatunk információt, amely azonban domináns, és egyes vélemények szerint a technika létjogosultsága megkérdőjelezhető¹⁵ (JONES és mts., 1997) annak ellenére, hogy mások bebizonyították: a technika megbízhatóan alkalmazható akár populációgenetikai vizsgálatokban is (LOUGHEED és mts., 2000; CSERGŐ és mts., 2009).

¹⁵ A „Molecular Ecology” folyóirat szerzői útmutatójában külön fejezetben hívja fel a figyelmet arra, hogy az elsődlegesen RAPD-on és iSSR-en alapuló tanulmányok közlését néhány speciális alkalmazástól eltekintve automatikusan visszautasítja.

Mindezek alapján az AFLP megfelelő módszer lehet a rózsza taxonok közötti kapcsolatok feltárására, ám meg kell jegyezni, hogy a filogenetikai elemzések eredményét a hiányos evolúciós modell miatt fenntartásokkal kell kezelni (KOOPMAN, 2005).

A ploid szint hatása a kapott eredményekre

A *Caninae* szekcióra jellemző kiegyenlítetlen meiózis fontos következménye, hogy a szekció hibridjeit matroklín öröklés jellemzi mind a fenotípusos tulajdonságok (WERLEMARK és NYBOM, 2001), mind pedig a molekuláris markerek (WERLEMARK és mts., 1999; NYBOM és mts., 2004, 2006) tekintetében. A megtermékenyítés során például a pentaploid anyai partner $4x$ – tetraploid szülő esetében $3x$, hexaploid szülő esetében $5x$ – kromoszómaszerelvénnel járul hozzá a zigóta genomjához, míg az életképes pollenek a szülő kromoszómaszámától függetlenül haploidok, $1x$ kromoszómaszerelvénnel.¹⁶ A rózsáknál gyakran tapasztalt erős anyai hatás másik oka lehet, hogy spontán apomixisre hajlamosak (WERLEMARK, 2000).

Az anyai öröklődés azonban a fenotípusos tulajdonságok esetén nem mindig érvényesül. Míg az epikutikuláris viaszok a *Caninae* szekción belüli reciprok keresztezésekben anyai öröklődést mutattak (WISSEMANN és mts., 2007), egyes tulajdonságok a *Caninae* szekcióban is apai vonalon öröklődnek (RITZ és WISSEMANN, 2003). Az apai öröklődésű tulajdonságok között ráadásul vannak olyanok is, amelyek fontos határozóbélyegek. Ilyen tulajdonság pl. a csészelevelek lehulló vagy fennmaradó volta a termésérés során. A *R. canina* és *R. rubiginosa* esetében *Caninae* meiózisuknak köszönhetően anyai öröklődést feltételezhetünk, ám WISSEMANN és RITZ (2007) megmutatták, hogy a két faj reciprok keresztezése esetén a csészelevél lehullása apai vonalon öröklődik. Ez zavart okozhat az egyes interspecifikus hibridek besorolásánál, ugyanis az apai tulajdonságok alapján valamely fajhoz sorolt taxonok a molekuláris markerek alapján a másik szülőhöz kerülhetnek közelebb.

A kiegyenlítetlen meiózis eredményeként a potenciális genetikai változékonyság csökken, mivel a szülői kromoszómák szétválásában és a homológ rekombinációban csak a hét bivalens vesz részt. Ezt ellensúlyozza ugyanakkor az a – szintén a kiegyenlítetlen meiózisnak köszönhető – tény, hogy a *Caninae* szekció egyedei könnyen képeznek fertilis hibrideket akár más szekciók tagjaival is, miközben képesek megtartani *Caninae* jellegüket.

A nem egyenletes öröklődés és marker-eloszlás lehet feltehetően az oka annak, hogy a rózsák markerezésével foglalkozó cikkek nagy többségében a feltehetően hibrid eredetű taxonokat – egy-egy állandósult hibridtől eltekintve, mint pl. a *R. damascena* – kihagyták, illetve kerülték (KOOPMAN és mts., 2008). Munkám során a mintakészlet ezért úgy került összeállításra, hogy

¹⁶ A pollen lehet diploid is ($n = 2x = 14$), amennyiben az egy tetraploid, nem *Caninae* szekcióból származik és meiózisa normál lefolyású.

a „stabil” taxonok mellett tartalmazzon számos hibrid taxont is, hogy megvizsgálhassam azok illeszkedését a rózsák nemzetség szekcióihoz. Az eredmények értelmezése során nem szabad megfeledkeznünk a rózsák sajátos ploidiaviszonyainak a fentiekben kifejtett következményeiről.

6.1.2. AFLP vizsgálatok

AFLP adatok, adatszerkezet

Az AFLP lókuszok között nagy számban fordultak elő olyanok, amelyek túlnyomórészt domináns (1) allélt hordoztak (12. ábra az 57. oldalon). Bár az AFLP sávok eloszlására kevés publikáció tér ki, KOOPMAN és mts. (2008) adatai jóval egyenletesebb eloszlást követnek, ugyanakkor azt maguk a szerzők is „szokatlanul egyenletesnek” nevezik. Annak a lehetőségnek a kizárására, hogy a domináns allélok túlsúlya esetleg a fragmensek rossz kiértékeléséből adódik, elsőként elvettem a domináns allélokat legnagyobb arányban hordozó lókuszokat, később pedig azokat a lókuszokat is, amelyeknél csupán 1–2 taxon esetében mutatkozott domináns allél, illetve 10 ismétlésben véletlenszerűen eltávolítottam a vizsgált lókuszok felét, vagy a vizsgált taxonok felét. Sem az adatok irányított, sem pedig randomizált szűkítése nem javította az NMDS stressz-értékét, ezért feltételezem, hogy az AFLP fragmenshosszok megfelelően kerültek kiértékelésre, az adatok megbízhatónak tekinthetők, így a továbbiakban a teljes adatkészlettel dolgoztam.

A nem metrikus többdimenziós skálázás (NMDS) nem számít elterjedt eljárásnak az AFLP adatok értékelésére, bár egyes tanulmányok elsősorban ezen kiértékelés alapján interpretálják eredményeiket (O’HANLON és mts., 1999). A főkomponens analízis ehhez hasonlóan alárendelt szerepet játszik az AFLP adatok értékelésében. Adataim NMDS és PCA elemzése alapján elmondható azonban, hogy a két módszer – de leginkább az NMDS – kiválóan alkalmas arra, hogy a vizsgált egyedek közötti hasonlóságokat, különbségeket – ha csak előzetes jelleggel is – felfedjük. A módszerek nagy előnye, hogy nem erőltetik csoportok kialakítását így a kétes helyzetű taxonok (pl. hibridek) nem kerülnek besorolásra egyik vagy másik lehetséges helyzetüknek megfelelően, elfedve így valódi intermedier helyzetüket.

A mintakészlet legegységesebb csoportjai – a *Rosa* és *Pimpinellifoliae* szekciók – már az NMDS és PCA elemzésekben is jól elkülönültek, ám a módszer nem bizonyult alkalmasnak arra, hogy a *Caninae* szekción belüli viszonyokat megmutassa. Már az NMDS elemzés eredménye (13. ábra az 58. oldalon) előrevetítette, mely taxonok lesznek úgymond problémásak (pl. [80] *R. heckeliana*, [63] *R. × speciosa*, [50] *R. jundzillii*, [119] *R. kmetiana*), azaz mely taxonok képeznek egyfajta átmenetet a jól elkülönülő csoportok között. Az NMDS eredménye a későbbiekben fontos háttérinformációt jelent a részletes fenetikai és filogenetikai elemzések interpretálása során.

Fenetikai értékelés

Az AFLP adatok értelmezésének egyik legelterjedtebben használt megközelítése a bináris adatmátrixból számított egyszerű különbségségi mutatókon alapuló csoportképzési eljárás (BONIN és mts., 2007). Ennek megfelelően a vizsgált rózsa taxonok elemzése során az első lépés az Ochiai különbségségi index alapján számított UPGMA fa felállítása volt. A dendrogram bootstrap támogatottsága általában alacsonynak bizonyult, nagyobb bootstrap értéket csupán az osztályozás első-második szintjei kaptak, a magasabb szintű osztályok – a *Caninae* szekció nagy kládjának kivételével – nem támogatottak a véletlen újra-mintavételezés alapján.

Az alacsony bootstrap támogatottság egyik okát abban látom, hogy a hibrid taxonok szüleik markereit vegyesen hordozzák, így helyzetük bizonytalan, a csoportképzési eljárást megzavarják. Az adatok véletlenszerű megváltoztatásával azok egyik vagy másik szülő taxonjukhoz kerülnek besorolásra, így a szigorú csoportképzési eljárás igen különböző fákat eredményez, amelyek konszenzusa végül nem tekinthető megbízhatónak. Ha a bootstrap adatok valóban a hibridek váltakozó besorolása miatt alacsonyak, akkor a bootstrap újra-mintavételezésből számított UPGMA fák készlete éppen azt az információt hordozza, amit a hagyományos konszenzus fa nem képes megjeleníteni.

Erre a problémára a fahálózatok metodikai csoportja jelentheti a megoldást, amely egy viszonylag új (HUSON és mts., 2009) eljárásnak tekinthető a faképzési módszerek között, amelyet eddig elsősorban elméleti, illetve modell adatmátrixokon alkalmaztak. Az elvárásoknak megfelelően számos hibrid taxon esetében feloldásra került a hibriditás által okozott helyzet. A hibridek legtöbbje – származásától függően – jól elkülönülő csoportot képzett és magyarázatot nyert a fának számos olyan ága, amely a hagyományos konszenzus fán nehezen volt összeegyeztethető a morfológiai bélyegeken alapuló osztályozással, illetve a taxonokkal kapcsolatos ismeretekkel. A hibridek elhelyezkedése ugyanakkor megfelelt az NMDS alapján vártakkal, ám az ábrázolás ezen módja jóval átláthatóbb, mint az NMDS esetében.

A fenetikai megközelítés önmagában kevésbé képes tehát megmagyarázni a kiterjedt hibridizációs múltú *Rosa* nemzetség rendszertani kapcsolatait, ám a bootstrap adatok fahálózattal történő interpretálása nagy segítséget nyújt egyes hibrid csoportok értelmezésében.

Filogenetikai hálózatok

A fahálózatokhoz hasonlóan a hibridizációs hálózatok is a filogenetika egy viszonylag új metodikai ágát képviselik (HUSON és KLOPPER, 2005). A neighbor-net hálózat már filogenetikai elvek figyelembe vételével ábrázolja az adatokat, ám továbbra is jelentős információvesztéssel jár az, hogy a fa felépítése távolságok és nem közvetlenül a változók alapján történik. A módszer a

neighbor-joining filogenetikai módszerhez hasonló elven működik, lényege az elágazások késleltetett rögzítése, amely lehetővé teszi egy csoport több élhez való kapcsolását (BRYANT és MOULTON, 2004), így alakítva ki a filogenetikai hálózatot.

A módszer eredménye (18. ábra a 65. oldalon) gyakorlatilag megegyezett a hagyományos fenetikai értékelés során kapott eredményekkel, a csoportok késleltetett összekapcsolása nem bizonyult elegendőnek ahhoz, hogy a hibrid taxonok jól megfigyelhetőek legyenek a fa szerkezetében, ez a módszer nem adott a fenetikai elemzésekhez képest többlet-információt.

A neighbor-net hálózattal ellentétben a hibridizációs hálózatok már igyekeznek hibridizáción alapuló evolúciós modellt alkalmazni. Bár a marker fejlődését interpretáló modell továbbra sincs az AFLP módszerre optimalizálva, a hibridizáció lehetőségének beépítése az evolúciós modellbe döntő előnyökkel járhat. A dolgozatomban használt hibridizációs hálózat-építő eljárás alkalmas arra, hogy közvetlenül bináris adatokból építsen hálózatot (HUSON és KLOPPER, 2005).

Az elvégzett elemzések közül a hibridizációs hálózat (19. ábra a 66. oldalon) volt az, amely a legjobban támogatta a klasszikus rózsa rendszereket, ezen belül is elsősorban a *Caninae* szekció egyes alszekcióit (*Caninae*, *Rubigineae*), míg más szekciók (*Vestitae*, *Trachyphyllae*) továbbra sem különültek el határozottan.

6.1.3. A vizsgált rózsa taxonok rendszertani viszonyai

Az alábbiakban megkísérlem – a mintakészlet által meghatározott kereteken belül – a *Rosa* nemzetség vizsgált taxonjainak rendszertani viszonyait röviden bemutatni, értelmezni.

Sect. Pimpinellifoliae ♦ A *Pimpinellifoliae* szekció kivétel nélkül minden elemzésben jól definiált csoportot, kládot alkotott, ami alátámasztja a szekció elkülönítését a *Rosa* nemzetségen belül; meg kell azonban jegyeznünk, hogy a három vizsgált egyed genetikailag feltehetően igen közel áll egymáshoz, azok nem képviselik a teljes *Pimpinellifoliae* szekciót. Több esetben ebbe a csoportba került besorolásra a *R. heckeliana*, ugyanakkor az NMDS diagramon látható, hogy a taxon valóban elkülönül a *Caninae* szekció egyedeitől. A közös csoportba sorolást okozhatja az, hogy a *Pimpinellifoliae* szekció és a *R. heckeliana* egyaránt élesen elkülönülnek a többi vizsgált egyedtől. A hibridizációs hálózat eredménye megerősíti (KOOPMAN és mts., 2008) megfigyeléseit, akiknek bayes-i elemzésében a szekció a rózsa nemzetség egyik alapi szekciójaként jelent meg.

Sect. Rosa ♦ A *Rosa* szekció képviselői a *Pimpinellifoliae* szekcióhoz hasonlóan jól definiált csoportot alkottak annak ellenére, hogy számos vizsgált interszekcionális hibrid egyik oldalról a *Rosa* szekciótól származtatható, ezek közül némelyik gyakran a *Rosa* kládra, illetve csoportba került ([119] *R. × kmetiana*, [50] *R. jundzillii*). A (23) *R. × francofurtana* F₁ hibridet a hibridizációs

hálózat közvetlenül a „klasszikus” (22) *R. francofurtana* mellé sorolta, míg a fenetikai elemzések során a két taxon között nem mutatkozott kapcsolat. A *Rosa* szekció körülhatárolt jellege, illetve megfigyelt kapcsolata a *Caninae* szekcióval egyezik a korábbi molekuláris genetikai vizsgálatok eredményeivel (RITZ és mts., 2005; KOOPMAN és mts., 2008).

Sect. Caninae ♦ A *Caninae* szekció jól körülhatárolható csoportot alkotott mind a fenetikai, mind pedig a filogenetikai elemzések során, ám az alszekciók tekintetében a helyzet kevésbé egyértelmű. Az alszekciók összevetését a szakirodalmi adatokkal megnehezíti, hogy kevés tanulmány tér ki azok elemzésére. A *Rubigineae* alszekció *Caninae* szekción belüli KOOPMAN és mts. (2008) által megfigyelt határozott elkülönülését csak a hibridizációs hálózat igazolta. A *Vestitae* és *Trachyphyllae* szekciók polifiletikus jellege KOOPMAN és mts. (2008) ezen alszekciókra vonatkozó következtetéseivel összhangban, az AFLP adatok alapján nem teszi indokolttá azok alszekció szintű besorolását, elhatárolását a *Caninae* alszekciótól.

Az AFLP technika alkalmazhatósága komplex rendszertani kérdések vizsgálatára

Eredményeim alapján az AFLP kiválóan használható olyan komplex múltú rendszertani csoportok vizsgálatára, mint amilyen a *Rosa* nemzetség. Az AFLP adatokból számított távolságok bootstrap újra-mintavételezéséből rajzolt fahálózat, továbbá a hibridizációs hálózat együttesen alkalmazva adhatják a megfelelő eszközt a kutató számára. Az előbbi módszer az egyes hibridek leszármazását magyarázza, illetve mutatja meg, míg a második a hibrid eredetű taxonok csoportképzést zavaró hatását képes feloldani.

Ezek az eredmények nagy segítséget nyújthatnak bármely más olyan taxoncsoport rendszertani kapcsolatainak értelmezése során, amelyeknek kialakulásában, illetve alakulásában a hibridizáció, az introgresszió meghatározó szerepet játszik. A szőlő egyike az ilyen nemzetségeknek, ahol az utóbbi időben egyre inkább középpontba helyeződik a kérdés: vajon a *V. sylvestris* önálló fajként értelmezhető-e, létezik-e még, és milyen szerepet játszott a *V. vinifera* faj kultúrevolúciójában (THIS és mts., 2006; BODOR és mts., 2010).

6.1.4. A *Pimpinellifoliae* szekció *CeII* polimorfizmusa

Az AFLP vizsgálatok mellett mintegy kontrollként, illetve annak megállapítására, érdemes-e belevágnunk a rózsák ITS alapú vizsgálatába, megvizsgáltam a *Pimpinellifoliae* szekció ITS polimorfizmusát.

RITZ és mts. (2005) a rózsák ITS típusait elemző tanulmányukban a *Caninae* és *Rosa* szekciók kivételével az ITS szekvenciákat közvetlenül, szubklónozás nélkül szekvenálták. WISSEMAN

(2000b) a *Caninae* szekcióban korábban bebizonyította, hogy a különböző kromoszómaszerelvények között az ITS régiók szekvenciáinak homogenizációja nem történik meg ellentétben a különböző *Aranchia* fajokkal (KOCH és mts., 2003) és mesterséges *Armeria* hibridekkel (AGUILAR és mts., 1999).

A heteroduplex-képzés nélküli kontroll esetén is megfigyelt nagy számú *CelI* vágási termék (20. ábra a 67. oldalon) megjelenésének oka feltehetően az, hogy a PCR reakció denaturációs ciklusában a különböző ITS szakaszokról származó egyszálú DNS formák egymással reasszociálódtak, így kialakulhattak olyan hibrid dsDNS molekulák, amelyekben a mismatchek már megtalálhatóak, így *CelI* szubsztráttá váltak. A heterozigóta diploid genomokról felszaporított PCR termékek heteroduplex jellege más alkalmazásokban is megfigyelhető, ahol a heterozigóta – és heteroduplex – PCR termékek mellett a megváltozott elektroforetikus tulajdonságok miatt ún. szellemcsávok jelennek meg.

Vizsgálataim során megfigyeltem, hogy a *Pimpinellifoliae* szekcióba tartozó minták nagyfokú polimorfizmust mutattak azokban az esetekben is, amikor heteroduplexképzés során referenciamintát nem adtam a reakcióhoz. Ennek alapján feltételezem, hogy a rózsák általam vizsgált csoportjának genomja a *Caninae* és *Rosa* szekciókhoz hasonlóan több eltérő nrITS1 szekvenciát tartalmaz, ezek alapján a rózsák ITS alapú vizsgálata során a *Caninae* szekción kívül is szükséges lehet a szubklónozás és több allél szekvenálása.

A módszer önmagában nem tűnik alkalmasnak tehát átfogó filogenetikai és rendszertani tanulmányokra a rózsák esetében. A RITZ és mts. (2005) által közölt ITS szekvenciák illesztése alapján nagyobb mértékű polimorfizmusra számítottam a vizsgált *Pimpinellifoliae* és *Rosa* szekcióba tartozó taxonok között. A módszer előnye lehet egyben, hogy az AFLP technikával szemben minimális különbözőséget detektáltam egy adott fajon belül. Ezek alapján a módszer akár alkalmazható lehet ismeretlen rendszertani besorolású tételek fajsztípus azonosítására, pl. vitatott kérdéses génbanki tételek hovatartozásának tisztázására. Ezek azonban elsősorban felvetések, létjogosultságukat mindenképpen igazolni kell. A referenciaminta belső polimorfizmusa által okozott problémára megoldást jelenthet egy klónozott rózsák ITS szakasz referencia mintaként történő felhasználása.

6.2. A szőlő-magvatlanság markerezése

6.2.1. Az SCC8 marker öröklődése a vizsgált családokban

SI hibridcsalád

Az SI és TII hibrid családokon végzett markerezési munkák során egyaránt megfigyeltem olyan SCC8 genotípusokat, amelyek null-allélok jelenlétére utalnak valamelyik szülőben.

Az SI család esetében a magvatlan 'Flame Seedless' apavonalat a szakirodalom (ADAM-BLONDON és mts., 2001) $SCC8^{+}/?$ genotípusúként írja le, azaz az $SCC8^{+}$ allél mellett vagy egy szintén domináns allélt, vagy pedig egy null-allélt hordoz. A CSÉT164 apavonal $SCC8$ genotípusa előzőleg ismeretlen volt, vizsgálataim alapján elsődlegesen elmondható, hogy $scc8^{-}/?$ genotípusú. Az, hogy az utódpopulációban $SCC8^{+}/?$ genotípusú egyedek is előfordultak, továbbá hogy igen nagy számban tapasztaltam olyan eseteket, amelyekben a SCAR-CAPS marker PCR lépése sikertelen volt, arra utalnak, hogy a CSÉT164 szintén tartalmaz egy null allélt, azaz $SCC8$ genotípusa $scc8^{-}/0$.

Ezt a feltételezést alátámasztja az a tény, hogy a 0/0 genotípusú egyedek esetében 50 °C primerkötési hőmérsékletet alkalmazva kaptunk PCR terméket – a DNS-minták tartalmaztak tehát DNS-t és az PCR reakcióra alkalmas volt –, ezek azonban csak a PCR termék végénél található hasítóhelyet tartalmazták, illetve egyszer sem sikerült teljes emésztést elérni. Ezek, illetve az $SCC8$ lókuszt jellemzése során kapott eredmények (5.4. fejezet) alapján a csökkentett primerkötési hőmérséklettel kapott PCR termék nem a magvatlanságért felelős *SdI* gént hordozó 18., hanem feltehetően a 4. vagy 19. kapcsoltsági csoportokról kerültek felszaporításra.

A fenti feltételezések alapján várható 1 $SCC8^{+}/scc8^{-}$: 1 $SCC8^{+}/0$: 1 $scc8^{-}/0$: 1 0/0 hasadási arány (7. táblázat a 70. oldalon) a χ^2 -próba alapján 85 %-os megbízhatósági szinttel sem vethető el, így feltételezem, hogy a 'Flame Seedless' fajta pontos $SCC8$ genotípusa $SCC8^{+}/0$, a CSÉT164 hibrid genotípusa pedig $scc8^{-}/0$.

Annak ellenére, hogy az SI családban mindkét szülő hordoz egy null allélt, az $SCC8$ SCAR-CAPS marker továbbra is megbízhatóan prognosztizálta a vizsgált egyedek fenotípusát, a marker használhatónak bizonyult a sztenospermokarp magvatlanosság kimutatására, illetve előrejelzésére.

TII hibridcsalád

A TII családban – az SI családdal ellentétben – kizárható, hogy az apavonal null allélt hordozzon, mivel a 'Superior Seedless' $SCC8$ genotípusa $SCC8^{+}/scc8^{-}$. Ugyanakkor – az SI családhoz hasonlóan – ebben az esetben is voltak olyan minták, amelyek $SCC8^{+}/?$ genotípust mutattak a gélen, továbbá olyan egyedek is, amelyek esetében nem sikerült az $SCC8$ lókuszt felszaporítanom. Amennyiben a 'Superior Seedless' gélképét tekintem mérési hibának, akkor az SI családhoz hasonló modell lenne feltételezhető, ez azonban a χ^2 próba alapján 98 %-os megbízhatósági szinten elvethető (7. táblázat). Amennyiben a két esetben megfigyelt 0/0 gélképet tekintem a marker alkalmazásával kapcsolatos problémának, 2 $scc8^{-}/?$: 1 $SCC8^{+}/scc8^{-}$: 1 $SCC8^{+}/0$ hasadási arányt kellene kapnunk, amely eloszlás χ^2 -értéke közel megegyezik az SI családban, 1:1:1:1 arányú eloszláshoz kapott χ^2 -értékkel, ám ennek a vizsgálatnak szabadságfoka kisebb, így ugyancsak elvethető. Fontos megjegyezni, hogy ebben az esetben a χ^2 próbánál teljesen figyelmen kívül

hagytam a 0/0 genotípusokat. A gélen megfigyelt típusok aránya legjobban ahhoz az alaphelyzet-hez közelít, amelyben egy heterozigóta és egy recesszív homozigóta keresztezésével 1:1 arányú hasadást kapunk, ám ebben az esetben az $SCC8^{+}/?$ típust műterméknek, a 0/0 típust pedig technikai problémának kell tekinteni, erre azonban a többi család esetében nem volt példa.

Az, hogy mindkét családban (SI és TII) – még ha alacsony arányban is – megfigyelhető volt az $SCC8^{+}/?$ típus jelenléte, arra enged következtetni, hogy a 'Superior Seedless' pontos $SCC8$ genotípusa $SCC8^{+}/scc8^{-}$, míg a 'Palatina' fajtaé $scc8^{-}/0$. Utóbb a 'Palatina' fajta esetében szintén null allél jelenlétére következtettek tanulmányukban KÖRPAŠ és mts. (2009).

A 'Superior Seedless' fajta esetében az irodalomban nem található utalás annak genotípusára. A VIVC adatbázis információi szerint a fajta a 'Sugra One' mutációjával jött létre, mások a fajtanevet a 'Sugra One' piaci elnevezéseként tartják számon (KÖZMA, szóbeli közlés). ADAM-BLONDON és mts. (2001) a 'Sugra One' $SCC8$ genotípusát $scc8^{-}/0$ -ként közlik. Az ellentmondás egyik oka lehet az, hogy a Budapesti Corvinus Egyetem gyűjteményében található 'Superior Seedless' nem fajtaazonos – a fajtakeveredés előfordulhatott ugyanakkor ADAM-BLONDON és mts. (2001) mintakészletében is. A 'Sugra One' egyik szülője a 'Cardinal fajta', amelynek genotípusa $scc8^{-}/0$ (ADAM-BLONDON és mts., 2001), másik szülője ismeretlen.

Bár az utóbbi időben több tanulmány is született, amelyek a csemegeszőlő-fajták származási viszonyait igyekeznek tisztázni elsősorban SSR markerekkel (IBANEZ és mts., 2009; VARGAS és mts., 2009), azok nem vizsgálták sem a 'Sugra One', sem pedig a 'Superior Seedless' fajtákat, így a fajta származására vonatkozóan egyelőre nem rendelkezünk molekuláris genetikai adatokkal. GALBÁCS és mts. (2009) 12 mikroszetellit lókuszt vizsgálataival végzett tanulmányában a Kárpát-medencei és világfajták – köztük több csemegeszőlő-fajta – mellett szerepel a 'Superior seedless' fajta, eredményeik alapján azonban nem található a vizsgált fajták között olyan magvatlan genotípus, amely a 'Superior seedless' magvatlanság-forrásaként szóba jöhetne.

A TII családban – az SI családdal hasonlóan – a marker által prediktált fenotípus megegyezett a növények fenotípusával, az $SCC8$ SCAR-CAPS marker alkalmasnak bizonyult a magvatlanság markerezésére.

Az SI és TII családok mérete nem teszi lehetővé a precíz statisztikai elemzést, és bár a hasadási arányokat valamelyest támogatják a χ^2 -próba eredményei, a szülők pontos $SCC8$ genotípusával kapcsolatos következtetéseket mégis leginkább a gélen megfigyelt mintázat támasztja alá.

VRH 3082-1-42 (BC₄) × 'Kismis moldavszkij' család

A BC₄ × 'Kismis moldavszkij' keresztezésben a magvatlanság-forrásként használt 'Kismis moldavszkij' fajta $SCC8$ lókuszt nézve a várt képet mutatta: $SCC8^{+}/scc8^{-}$ heterozigótának bizonyult, ezt utóbb KÖRPAŠ és mts. (2009) is igazolták. A BC₄ magvas anyavonal ezzel ellentétben

SCC8^{+/?} genotípusú, azaz „homozigóta magvatlanként” viselkedett. Az utódnemzedék markerezése során kapott eredmények (9. táblázat a 74. oldalon) alapján valószínűsíthető, hogy a BC₄ hordoz egy null allélt és egy rekombináns allélt. Az *scc8*^{-/?} genotípus gyakori előfordulása, valamint annak alapján, hogy a felállított elméleti *SCC8* hasadási arány a χ^2 próbában még 70 %-os megbízhatósági szinten sem vethető el, a null allél jelenléte bizonyítottan tekinthető.

A *SCC8*⁺ allél jelenlétére a BC₄-ben két magyarázat is elképzelhető: pontmutáció a hasítóhelyben, illetve rekombináció az *SCC8* és *SdI* lókuszok között. A 'Kismis moldavszkij' és BC₄ *SCC8* alléljainak szekvenciái (27. és 28. ábrák a 76. oldalon) alapján kimutatható azonban, hogy a BC₄ domináns *SCC8*⁺ allélja nem pontmutáció, hanem rekombináció eredménye.

6.2.2. Az *SCC8* lókusz jellemzése

Munkám során bebizonyosodott, hogy a LAHOGUE és mts. (1998) által tervezett primerek nem csak a magfejlődés inhibitor *SdI* lókuszt hordozó 18., hanem a szőlő 4. és 19. kapcsoltsági csoportjáról is felszaporít(hat)nak egy közel 1 kb hosszúságú szakaszt. Ezt alátámasztják a lecsökkentett (50 °C) primerkötési hőmérséklettel végzett kísérletek, amikor a PCR lépésben akkor is kaptam PCR terméket, amikor a primerek szekvenciájának megfelelő 60 °C-os primerkötési hőmérséklettel nem tapasztaltam amplifikációt, továbbá hogy a PCR termék hasítása alapján a fragmensek a 4. (pl. a 'Nimrang' fajta esetében, 22. ábra a 71. oldalon) vagy a 19. (pl. a 'Kismis moldavszkij' esetében, 26. ábra a 76. oldalon) kapcsoltsági csoportról származtak.

A három, *SCC8* primerekkel felszaporítható közel azonos méretű 'Pinot noir' lókusz jelenléte újabb bizonyítéka lehet a szőlő hexaploid eredetének (JAILLON és mts., 2007). Bár a lókuszok szekvenciája határozottan eltér (27. ábra a 76. oldalon és M4.1. melléklet), azok hasonlóságai, illetve közel azonos méretük alátámasztják a szőlő evolúciója során történt hexaploidizációt.

Továbbfejlesztett *SCC8* marker

Az *SCC8* marker továbbfejlesztésének kettős célja volt. Egyrészt olyan primerpár tervezése, amely csak a 18. kapcsoltsági csoportról amplifikál, másrészt a null allél esetleges felszaporítása.

Az új primerpárok nem kötődtek *in silico* a 'Pinot noir' genomszekvenciájának 4. és 19. kapcsoltsági csoportjához még 30 % hiba (mismatch) engedélyezésével sem, ugyanakkor mindkét allélon megtalálják a komplementer szekvenciákat. A magvatlanság nyomonkövetésére mindamellettt változatlanul alkalmasnak ígérkeznek (30. ábra a 79. oldalon), az *scc-F6* – *sccR914* primerpár az eredeti *SCC8* primerpárral megegyező eredményt adott.

Az új primerpárokkal sem lehetett felszaporítani azonban a null allélt. Amennyiben a null-allélt mégis felszaporította volna, akkor annak a gélen meg kellett volna jelennie (30. ábra). Ha ugyanis

az domináns ($SCC8^+$), akkor az $scc8^-/0$ genotípusú 11-7/6 egyednél látszania kellene, ha pedig recesszív ($scc8^-$), akkor pedig a BC_4 gélképén kellene heterozigóta genotípust látnunk.

A fenti megfigyelések ellentmondanak KORPÁS és mts. (2009) feltételezésének, amely szerint – DAKIN és AVISE (2004) mikroszatellitek esetében tapasztalható null allélokkal kapcsolatos javaslataira alapozva – a null allél jelenlétét a primerkötőhelyekben történt pontmutációkkal magyarázzák.

Mind a magvas, mind pedig a magvatlan szőlőfajtákban megfigyelt null allél tehát feltehetően nem a PCR során használt primerek „tökéletlensége” miatt viselkedik null allélként, hanem ezekben az egyedekben nagyobb mértékű kromoszóma átrendeződések, mutációk történhetnek.

Mind a BC_4 rekombináns alléljának, mind pedig a 'Kismis vatkana' $SCC8^+$ és $scc8^-$ alléljainak szekvenciái nagyfokú hasonlóságot mutattak: típuson belül 98–99 %-ban, a domináns és recesszív allélok között pedig 96–97 %-ban egyezett a szakasz nukleotid-sorrendje. A 'Kismis moldavszkij' és BC_4 allélok nagyfokú azonossága azért is meglepő, mert a keresztezésben résztvevő szülők földrajzi származása – a *Vitis rotundifolia* fajról nem is beszélve – jelentősen eltér. A visszakeresztezéses nemesítés során elsősorban occidentalis fajtákat használtak ('Malaga', 'Cabernet sauvignon', 'Grenache noir', 'Merlot noir', 'Aubin'), míg a 'Kismis moldavszkij' az orientalis csoportba sorolható.

A VRH 3082-1-42 (BC_4) rekombináns allélja

Felvetődik mindezek alapján a kérdés, honnan származik a BC_4 rekombináns allélja? A rekombináns allél jelenlétéhez a genotípus pedigréjében jelen kell lennie a rekombináns allélnek, illetve – amennyiben a rekombináció a visszakeresztezéses nemesítés során történt – szerepelnie kellene egy magvatlan, vagy $SCC8^+$ allélt hordozó magvas fajtának.

Az $SCC8^+$ allélt eddig olyan magvas fajtákban mutatták ki (ADAM-BLONDON és mts., 2001), amelyek feltehetően szoros kapcsolatban állnak a 'Thompson Seedless' fajtával ('Dastachine' – a 'Szultanina' feltételezett utóda vagy őse, illetve 'Gora Chirine', 'Ouroum Uzjum' és 'Sultana monococco' – a 'Szultanina' feltételezett mutánsai), illetve olyan fajtákban mutatták ki, amelyek eredetéről keveset tudunk ('Chaouch blanc', 'Pizzutello nero', 'Santa Paula'). A domináns $SCC8^+$ allél jelenlétét a 'Chaouch' fajtacsoportban KORPÁS és mts. (2009) is kimutatták a 'Couche rose' fajtánál. A 'Pizzutello nero' fajtával kapcsolatban VARGAS és mts. (2009) megmutatták, hogy a különböző fajtagyűjteményekben eltérő genotípusokat tartanak nyilván ezen a néven, a fajta szüleinek a 'Cornichon blanc' és 'Prune de Cazouls' fajtákat javasolják, amely utóbbi a 'Thompson Seedless'-hez hasonlóan feltehetően keleti származású. ADAM-BLONDON és mts. (2001) által 'Santa Paula' néven vizsgált fajta ugyanakkor a VIVC adatai szerint éppen a fent említett 'Cornichon blanc' szinonímja. A 'Pizzutello nero' és a 'Santa Paula' fajták bogyói

halhólyag alakúak és a magok felében az embrió abortálódik (ADAM-BLONDON és mts., 2001), így elképzelhető, hogy az *SdI* allél ezekben a fajtákban jelen van, ám az csak részben fejt ki hatását.

6.2.3. MAS az SCC8 markerrel

A magvatlanságért felelős domináns inhibitor *SdI* gén mellett a sztenospermokarp magvatlanság kialakulását további recesszív gének is befolyásolják (BOUQUET és DANGLOT, 1996). Az *SdI* allél jelenléte szükséges feltétele ugyan a sztenospermokarpia kialakulásának, ám nem elégséges a fogyasztó szemszögéből magvatlannak tekinthető bogyók kialakulásához, ehhez a további recesszív gének jelenléte is szükséges.

Eredményeim a marker alkalmazhatóságát igazolják a vizsgált utódnemzedékekben, más kombinációk esetében azonban a marker felhasználhatóságát igazolni kell.

A keresztezésekben használt szülők *SCC8* genotípusa nagyban befolyásolja a marker alkalmazhatóságát. Az ifj KOZMA PÁL nemesítési programjában használt, a dolgozatban vizsgált magvatlan genotípusok közül egyedül a 'Kismis moldavszkij' magvatlanság-forrás teszi lehetővé, hogy a BC₄ rezisztencia-forrással végzett keresztezésekben az utódokon előrejelezzük a magvatlanságot. A 'Nimrang' fajta genotípusa 0/0, így azt *SCC8*⁺/*scc8*⁻ és *SCC8*⁺/0 genotípusú magvatlanság-forrásokkal kombinálva az *SCC8* marker alkalmazhatónak ígérkezik. A 'Kismis vatkana' esetében a pontos *SCC8* genotípus nem ismert. Amennyiben *SCC8*⁺/0 genotípusú, akkor a magvatlan utódok mintegy fele kimutatható a markerrel, amennyiben azonban *SCC8*⁺/*SCC8*⁺, a marker egyáltalán nem alkalmazható. A 'Kismis moldavszkij' fajta, esetében a marker tökéletesen alkalmasnak bizonyult a tulajdonság nyomonkövetésére.

A marker alkalmazhatósága azonban nemcsak a magvatlanság-forrásként használt szülőn múlik. A BC₄ esetében a markerezést nagyban megnehezíti, hogy a genotípus két allélja közül egyik sem a marker kifejllesztése során leírt módon működik (rekombináns és null allél). Ez az oka annak, hogy a BC₄ esetében csak a marker szempontjából ideális, *SCC8*⁺/*scc8*⁻ magvatlan apavonal használata esetén alkalmazható az *SCC8* marker.

A TII hibridcsaládban ezzel ellentétben az *SCC8*⁺/0 genotípusú magvatlanság-forrás esetén is használhatónak bizonyult a marker, mivel az apavonalban nem volt rekombináns allél.

Vizsgálataim során nem figyeltem meg rekombináns egyedeket az utódnemzedékekben. Az *SCC8* és *SdI* egyedek közötti rekombinációs események egy része nem jelenik meg az utódpopulációban, az SI és TII családokban az anyavonalak *scc8*⁻ és null alléljai közötti rekombináció nem mutatható ki, a BC₄ × 'Kismis moldavszkij' esetében szintén kizárólag a magvatlan apavonalban történt rekombinációt detektálhattam volna. Az, hogy az összesen megvizsgált 124 utód közül egyetlen

esetben sem tapasztaltam rekombinációt, a két lókuszt között LAHOGUE és mts. (1998) által javasolt 0,7 cM távolságot támogatja szemben az ADAM-BLONDON és mts. (2001) által javasolt 4,0 cM-nal. Utóbbi tanulmányban 61 egyed között 2 rekombinánszt azonosítottak, ez azonban lehet a fenotipizálás hibája is. Az általam vizsgált egyedek között előfordult ($BC_4 \times$ 'Kismis moldavszkij' 13-7/1) külsőre közel teljesen kifejlett mag is, amely azonban nem tartalmazott endospermiumot, illetve kifejlett embriót.

ADAM-BLONDON és mts. (2001), valamint KÖRPAŠ és mts. (2009) munkájuk során arra a következtetésre jutottak, hogy az SCC8 marker jobban használható magvatlan \times magvatlan, mint magvas \times magvatlan keresztezésekben. Eredményeim azonban azt igazolják, hogy amennyiben a nemesítési program kialakítása során a szülőválasztáskor figyelembe vesszük a magvatlan szülők SCC8 genotípusát és azokat ennek megfelelően választjuk ki, akkor a marker megbízhatóan alkalmazható a magvatlanság nyomonkövetésére magvas \times magvatlan keresztezésekben is. A marker használhatóságának eltérő megítélése adódhat természetesen az eltérő elvárásokból. Amennyiben a teljes mértékű, a 'Thompson Seedless' magvatlanságát megközelítő sztenospermokarpia markerezése a célunk, úgy valóban jobb hatékonyságot érhetünk el a magvatlan \times magvatlan keresztezésekkel, ám ez kevésbé a marker használhatóságán múlik, mint azon, hogy a magvatlanság mértékét befolyásoló egyéb genetikai faktorok – és természetesen maga az *Sdl* inhibitor gén – ezekben a keresztezésekben nagyobb eséllyel kerülnek homozigóta állapotba.

Egy olyan összetett tulajdonság esetében, mint a szőlő sztenospermokarp magvatlansága, az SCC8 marker elsősorban arra alkalmas, hogy a magvatlanság lehetőségét kimutassa. Hogy az egyes egyedek ezentúl milyen mértékű magvatlanságot mutatnak (32. ábra), az a többi gén öröklődésének függvénye, annak előrejelzését az *Sdl* génhez kapcsolt markertől nem várhatjuk.

6.2.4. A magvatlanság öröklődése a vizsgált nemzedékekben

Mind az SI és TII hibridcsaládokban, mind pedig a $BC_4 \times$ 'Kismis moldavszkij' keresztezés F_1 nemzedékében a fenotípusos hasadási arány közel 1:1 volt. Ez megfelel STOUT (1939) megfigyeléseinek, aki a szőlő sztenospermokarp magvatlanságának öröklődését egyetlen domináns génnel magyarázza. Az 1:1 arányú hasadás a szülők genetikai összetételén is múlik. ROYTCHÉV (1998) megállapította, hogy a magvas \times magvatlan keresztezésekből kapott magvatlan utódok aránya nő a fajták közötti genetikai távolsággal, minél komplexebb keresztezést végez a nemesítő, annál nagyobb arányban kap magvatlan utódokat – természetesen a genetika határain belül, legfeljebb 50 %-ban.

A dolgozatban vizsgált családokra feltehetően érvényes, hogy a szülők között viszonylag nagy a genetikai távolság. Az SI és TII családokban az anyai vonalak mindkét esetben interspecifikus vérvonalat hordoztak a 'Seyve Villard' hibridektől, a BC_4 szintén interspecifikus hibrid, amelynek



(a) A bogyókban 0-2 apró, puha mag található endospermium nélkül



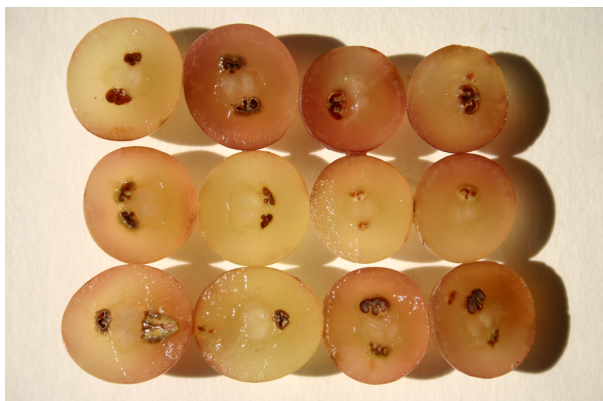
(b) A bogyók 1-3 apró, puha, endospermium nélküli magot tartalmaznak



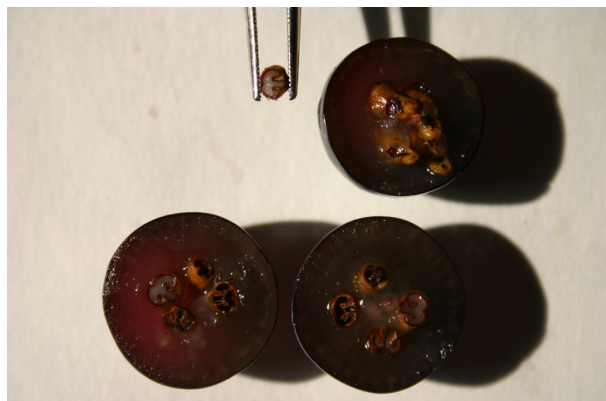
(c) A bogyókban 2-4, endospermium nélküli puha mag található



(d) A bogyókban 2-4 mag található, azok puhák, endospermiumot csak ritkán tartalmaznak



(e) A bogyóban csak két mag található, azok puhák, esetenként kemények, nagyrészt endospermium nélkül



(f) A bogyóban kemény magok találhatók, ám azok nagy részében nincs endospermium, „léhák”

32. ábra: A magvatlanság különböző formái egy hasadó nemzedékben. A bemutatott bogyók ifj. KOZMA PÁL 'Nimrang' × 'Kismis vatkana' keresztezéséből származnak. (Fotók: Hoffmann Sarolta)

előállításakor a *Vitis rotundifolia* fajt *occidentalis* borszőlő-fajtákkal keresztezték vissza, ugyanakkor a magvatlanság a 'Szultanina', ill. szintén keleti eredetű 'Kismis moldavszkij' fajtától ered.

A sztenospermokarp magvatlanság öröklődésére felállított modellek legtöbbje rendkívül szigorúan kezeli a magvatlanságot, csak a teljes mértékben magvatlan genotípusokat fogadja el magvatlan fenotípusúnak. SPIEGEL-ROY és mts. (1990) ilyen alapfeltételezés mellett tettek javaslatot a recesszív génekkel történő öröklődésre. EBADI és mts. (2009) 22 magvas \times magvatlan keresztezésben vizsgálták a magvatlanság öröklődését, és ugyan a magvatlan típusok között különbséget tettek teljesen magvatlan, félig magvatlan és félig magvas osztályok felállításával, a teljesen magvas egyedek aránya 51 % volt, bár számos keresztezés utódpopulációjának mérete 10 alatt maradt.

Eredményeim BOUQUET és DANGLLOT (1996) elméletét támogatják, miszerint a szőlő sztenospermokarp magvatlanságának kialakulásában központi szerepet tölt be egy domináns gén, és ennek hatását módosítják a recesszív gének. Az *SdI* gén teljes dominanciája megkérdőjelezhető ugyanakkor, ahogyan azt LAHOGUE és mts. (1998) megmutatták.

A magvatlanság genetikai meghatározottságának tisztázása mellett kérdés azonban, hogy fogyasztói szempontból szükség van-e a teljes magvatlanságra. A még észrevehető, de apró és puha magkezdemények a fogyasztó számára a gyakorlatban ugyancsak a magvatlanság érzetét nyújthatják.

6.2.5. *SdI* génjelöltek

A LAHOGUE és mts. (1998), valamint CABEZAS és mts. (2006) által kifejlesztett SCC8 illetve VMC7F2 primerek lokalizálásával a 'Pinot noir' genomon¹⁷ lehetőség nyílik a magvatlansáért felelős génjelöltek megkeresésére. Az SCC8 *SdI* lókusztól való távolsága a szakirodalomban ellentmondásos (0,7 illetve 4,0 cM), a VMC7F2 markert 0,8 cM távolságra helyezik. A két lókuszt (SCC8 és VMC7F2) egymástól 1 megabázis (Mb) távolságra helyezkednek el, így a markerek összesen 2 Mb hosszúságú környezetét vizsgáltam meg. A 2 Mb hosszúságú szakaszon – amely igen sok ismétlődő szekvenciát tartalmaz – mintegy 100 automatikusan annotált gén található (M4.2. melléklet), amelyek közül azonban számos génnek igen alacsony az annotációs pontszáma.

Az alacsony annotációs pontszámok és az a tény, hogy a kérdéses kromoszómaszakasz a 18. kapcsoltsági csoport telomerikus régiójában található számos ismétlődő elemmel, megnehezíti a génjelöltek azonosítását, illetve magát az automatikus annotációt is. Az annotált gének közül a GSVIVG00025945001 azonosítójú *VvMADSbox5* az egyetlen, amelyet a szőlőben jellemeztek

¹⁷ A JAILLON és mts. (2007) által közölt 8 \times lefedettségű 'Pinot noir' genom és annak automatikus annotációja nyilvánosan elérhető a <http://www.genoscope.cns.fr/cgi-bin/ggb/vitis/gbrowse/vitis/> interentcímen. Dolgozatomban a genomszekvencia továbbfejlesztett, 12 \times lefedettségű verzióját használtam, amely azonban egyelőre nem érhető el nyilvánosan.

BOSS és mts. (2002). A fehérje legközelebbi *Arabidopsis thaliana* ortológja az *AGL11*, amely a termő- és magfejlődésben vesz részt, illetve a termőben és a magban nyilvánul meg (BATTAGLIA és mts., 2006). BOSS és mts. (2002) kísérleteiben a *VvMADS-box5* csupán a nővirágokban nyilvánult meg, a vizsgált MADS-box homológok közül ez a fehérje volt jelen legnagyobb mennyiségben a magban, továbbá – ha alacsony koncentrációban is – a bogyóban is kimutatható volt.

A *VvMADS-box5* mellett található azonban a kérdéses kromoszómaszakaszon még egy MADS-box gén: a GSVIVT00025916001, amelynek legközelebbi *A. thaliana* ortológja az (AGAMOUS-LIKE 12 (AGL12), amely az *A. thaliana*-ban a gyökérfejlődésben vesz részt (TAPIA-LÓPEZ és mts., 2008).

Prediktált funkciója alapján szintén kiemelt figyelmet érdemel a GSVIVG00025941001 gén. A géntermék legközelebbi *A. thaliana* ortológjának feltételezhetően kadmium-ion kötő aktivitása van (KUNG és mts., 2006), ugyanakkor tartalmaz egy EFB1 γ elongációs faktor (JEPPESEN és mts., 2003) domént is.

A mintegy 100 gén között szerepelnek olyanok, amelyek a betegség-ellenállóságban játszhatnak szerepet (GSVIVG00025992001, GSVIVG00025955001, GSVIVG00025948001, GSVIVG00025947001), illetve számos kináz aktivitású fehérje (GSVIVG00026021001, GSVIVG00026020001, GSVIVG00026016001, GSVIVG00026007001, GSVIVG00026000001).

A kromoszómaszakaszon található legtöbb automatikusan annotált génnek azonban nincsen fehérje-ortológja sem a rizsben, sem pedig a lúdfűben, ráadásul a fehérjetalálatok sokszor feltételezett, illetve hipotetikus fehérjékre hivatkoznak, vagyis azoknak még csak az expressziója sem igazolt fehérje szinten, nemhogy funkciójukról bármiféle ismerettel rendelkezünk. Az annotált gének legtöbbször több-kevesebb EST-találat is támogatja, ez azonban nem garantálja azt, hogy az RNS-ről intakt, funkcióképes fehérje is képződik. A kérdéses kromoszómaszakaszon található gének EST-információi alapján elmondható, hogy a gének több mint fele expresszálódik a virágban, magban, embrióban vagy termésben, ám az EST találatok arányára alapozó vizsgálatoknál feltétlenül figyelembe kell vennünk azt, hogy a szőlőben készített sok EST könyvtárat a generatív fázisra koncentrálnak készítettek el PENG és mts. (2007).

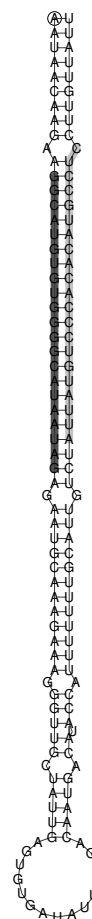
Bár a gének prediktált funkciója alapján egyes annotált géneket kiemelt figyelemmel kezelhetünk, a gyakorlatban nem zárhatunk ki a 100 gén közül egyet sem. A lúdfű vagy rizs ortológok – amennyiben ilyenek vannak – expressziós mintázatáról részletes információk állnak rendelkezésre, ám a kérdéses gén szőlőben tapasztalható expressziós mintázatára vonatkozóan ebből nem vonhatunk le messzemenő következtetéseket. Az egy géncsaládba tartozó homológok és paralógok expressziós mintázata nagyban eltérhet (CHEN és mts., 2006).

Az SCC8 kromoszómális régiója már az első 'Pinot noir' szekvencia publikálása (JAILLON és mts., 2007) óta azonosítható. Az *SdI* gént műszeres és humán-erőforrásokkal jól felszerelt laboratóriu-

mok keresik, amelyekben célzott expressziós kísérletekből számos információ áll rendelkezésre a szőlő magvatlanságával kapcsolatban. HANANIA és mts. (2007, 2009) a 'Thompson Seedless' és annak magvas mutánsa közötti különbségeket szubsztraktív hibridizációval vizsgálja, míg JOSÉ M. MARTÍNEZ ZAPATER (szóbeli közlés) magvas és magvatlan fajták microarray adataival rendelkezik. Ennek ellenére a mai napig nem található a szakirodalomban olyan munka, amelyben egy *SdI*-jelölt gén funkcionális analízisééről számolnának be.

Ennek egyik lehetséges oka, hogy a két marker távolságát az *SdI* lókusztól alulbecsülik, jóval nagyobb kromoszómaszakaszt kellene átvizsgálni. A másik lehetséges ok, hogy a tulajdonságot meghatározó gén nem fehérjét, hanem szabályozó szerepű miRNS-t kódol, amit az automatikus annotáció nem, vagy csak korlátozott mértékben képes felismerni. Ezt a lehetőséget BURGÁN JÓZSEF (szóbeli közlés) szőlő kisRNS adatai alapján nem zárhatjuk ki, a kérdéses kromoszómaszakaszon található ugyanis egy konzervált szőlő miRNS, a miRC16 (33. ábra).

A miRC16 prediktált célgénje a GSVIVT00008042001, amely tartalmaz egy ABC (ATP kötő kazetta) transzporter domént. Az ABC transzporter fehérjék az *A. thaliana* egyik legnagyobb fehérjecsaládját alkotják, a legkülönbözőbb folyamatokban vesznek részt a nehézfém-toleranciától a különböző stressz- és hormonválaszokon át a megvilágítás által szabályozott hipokotilmegnyúlásig (SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ és mts., 2001). A miRC16 célgénje nem tartalmaz hidrofób transzmembrán régiókat¹⁸, így az ABC transzporterek E és F osztályához sorolható. Ezek az osztályok nemigen jellemzettek növényben, feltehetően nem közvetlenül a transzmembrán folyamatokban vesznek részt, konzerváltságuk alapján alapvető funkciókat tölthetnek be (VERRIER és mts., 2008). Az E osztály egyik képviselőjének élesztőben a transláció során RNáz gátló aktivitása van, ennek *A. thaliana* homológja (AtRLI2) az RNS interferencia belső szupresszoraként működik, és a generatív szervekben expresszálódik a legmagasabb szinten (SARMIENTO és mts., 2006). Az F osztályt növényekben még nem jellemezték, élesztőben az eIF-2 α kináz aktivációjával



33. ábra: A szőlő konzervált miRC16 miRNS-ének másodlagos szerkezete. A sötétszürke háttér az érett, a világosszürke háttér a sztár szál helyzetét jelöli. (BURGÁN, szóbeli közlés)

¹⁸ <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

a transláció szabályozásában vesz részt (VERRIER és mts., 2008). A GSVIVT00008042001 szőlő EST találatai mind a bogyófejlődés különböző fázisaiban vett mintákból származnak.

A szőlő 18. kapcsoltsági csoportján található gének között fel lehet állítani tehát preferenciákat az *SdI* génjelöltek szempontjából, ám kizárni egyik annotált gént sem lehet. Azok célzott expressziós vizsgálatával, majd az így leszűkített gének funkcionális elemzésével juthatunk közelebb a keresett *SdI* inhibitor génhez.

6.3. Új tudományos eredmények

Magyarországi rózsza taxonok AFLP vizsgálata

1. Felmértem Magyarország egyes rózsza taxoncsoportjainak – köztük számos hibrid taxonnak – rendszertani kapcsolatait AFLP markerek segítségével. Igazoltam a *Pimpinellifoliae* és *Rosa* szekciók létjogosultságát, továbbá megállapítottam, hogy a vizsgált taxonok alapján a *Caninae* szekció *Vestitae* és *Trachyphyllae* alszekciói polifiletikusnak bizonyultak, azok elkülönülése a *Caninae* alszekciótól adataim alapján nem támogatott.
2. Az AFLP adatok fenetikai elemzésének bootstrap újramintavételezéséből számított UPGMA fák hálózata nagy részben képes volt feloldani és megjeleníteni az egyes *Rosa* taxonok hibrid eredetét, míg a hibridizációs hálózatok a hibrid taxonok bevonása mellett is támogatták a rózsza nemzetség vizsgált szekcióinak és egyes alszekcióinak elkülönítését.
3. Megállapítottam, hogy két eltérő ploidisztű ($2n = 5x = 35$, illetve $2n = 6x = 42$) *Rosa gallica* taxon esetében a ploidia foka nem befolyásolta az AFLP markerek alapján történő osztályozást, azok a különböző ploiditás ellenére is szoros kapcsoltságot mutattak.

A szőlő-magvatlanság markerezése

4. Megállapítottam, hogy a 'Flame Seedless' és 'Palatina' fajták egyaránt tartalmaznak egy-egy *SCC8* null allélt, meghatároztam a nevezett fajták pontos *SCC8* genotípusát: $SCC8^{+}/0$, illetve $scc8^{-}/0$. Az ifj. KOZMA PÁL nemesítési programjában rendszeresen használt BC₄ multirezisztens fajhibrid esetében bizonyítottam egy rekombináns $SCC8^{+}$ és egy null allél jelenlétét.
5. Az SI, TII és VRH 3082-1-42 (BC₄) × 'Kismis moldavszkij' családokon igazoltam az *SCC8* marker alkalmazhatóságát a szőlő sztenospermokarp magvatlanságának predikciójára.
6. Az *SCC8* marker továbbfejlesztéséhez új primereket terveztem, amelyek szelektívek a szőlő sztenospermokarp magvatlanságának domináns *SdI* inhibitor génjét hordozó kromoszóma-szakaszra a 18. kapcsoltsági csoporton.
7. Megállapítottam, hogy a VRH 3082-1-42 (BC₄) null allélja nem az *SCC8* lókuszt primerkö-tőhelyein bekövetkezett pontmutációk eredménye.

7. Összefoglalás

A molekuláris markerek több szinten szolgálhatnak értékes információval a növénynemesítő számára. A nemesítés során számításba vehető genotípusok – és általában egy adott növényfaj fajtái, fajtái – származásának és rokonsági kapcsolatainak tisztázása segíti a keresztezések megtervezését és az azt követő szelekciót. A szelekció összetett folyamatát a nemesítési programban egyes kiemelt hangsúllyal kezelt tulajdonságok molekuláris markerezése felgyorsíthatja, leegyszerűsítheti. Egyes esetekben – pl. a különböző eredetű rezisztenciagének piramidálása esetén – molekuláris markerekkel olyan genotípus szelekció is lehetővé válik, amelynek kivitelezése fenotípusos értékeléssel a gyakorlatban rendkívül időigényes és nehézkes.

A *Rosa* L. – és több más – nemzetség magyarországi nagy fajdiverzitása az ország földrajzi sajátosságaival magyarázható. A Kárpát-medencében három éghajlati tényező lép kölcsönhatásba egymással, ezen introgresszív ütközési vonalakon a rózsá nemzetségre általánosan jellemző gyakori interspecifikus hibridizáció komplex mintázatú változatosságot, valamint unikális fajokat eredményez. A morfológiai változatosság összetettsége miatt – beleértve a környezeti hatások által indukált eltéréseket is – a karakterek egyértelmű taxonómiai értelmezése gyakran nehézkes. Molekuláris markerek segítségével számos hátrány kiküszöbölhető, így alkalmasabbak lehetnek a magyarországi vadrózsák összetett genetikai kapcsolatainak feltárására. Kevés információval rendelkezünk ugyanakkor arról, mennyiben oldható fel a kiterjedt hibridizáció eredményeként létrejött genetikai mintázat AFLP markerek segítségével.

A *Caninae* szekcióra jellemző kiegyenlítetlen meiózis fontos következménye, hogy a szekció hibridjeit matroklín öröklés jellemzi mind a fenotípusos tulajdonságok, mind pedig a molekuláris markerek tekintetében. A rózsáknál gyakran tapasztalt erős anyai hatás másik oka lehet, hogy spontán apomixisre hajlamosak. A poliploidia széles skáláját (diploidtól oktaploidig) felvonultató rózsá nemzetség hibridjeinek AFLP analízisét a ploidiaszint mellett a matroklín öröklődés nehezíti, amelynek esetenként ellentmond egyes határozó bélyegek apai öröklődése.

AFLP adatok alapján munkám során igazoltam a *Pimpinellifoliae* és *Rosa* szekciók létjogosultságát, továbbá megállapítottam, hogy a vizsgált taxonok alapján a *Caninae* szekció *Vestitae* és *Trachyphyllae* alszekciói polifiletikusnak bizonyultak, azok elkülönülése a *Caninae* alszekciótól adataim alapján nem támogatott.

Az AFLP technika kiválóan használhatónak bizonyult egy olyan komplex múltú rendszertani csoport vizsgálatára, mint amilyen a *Rosa* nemzetség. Az AFLP adatokból számított távolságok bootstrap újra-mintavételezéséből rajzolt fahálózat, továbbá a hibridizációs hálózat együttesen alkalmazva adják a megfelelő eszközt a kutató számára. Az előbbi módszer az egyes hibridek leszármazását magyarázza, illetve mutatja meg, míg a második a hibrid eredetű taxonok csoportképzést zavaró hatását képes feloldani.

Ezek az eredmények nagy segítséget nyújthatnak bármely más olyan taxoncsoport rendszertani kapcsolatainak értelmezése során, amelyeknek kialakulásában, illetve alakulásában a hibridizáció, az introgresszió meghatározó szerepet játszik. A szőlő egyike az ilyen nemzetségeknek, ahol az utóbbi időben egyre inkább középpontba helyeződik a kérdés: vajon a *V. sylvestris* önálló fajként értelmezhető-e, létezik-e még, és milyen szerepet játszott a *V. vinifera* faj kultúrévolúciójában.

Bár a csemegeszőlő nemesítésben kívánatos sztenospermokarp magvatlanság genetikai háttere nem tisztázott teljes mértékben, az utóbbi években kialakult konszenzus alapján feltételezhető, hogy azt egy domináns inhibitor gén (*SdI*) irányítja, amelyhez kapcsolt markerek rendelkezésre állnak. Ezeket azonban minden szülőkombináció esetén tesztelni kell, meg kell vizsgálni, valóban alkalmas-e a marker a tulajdonság nyomkövetésére az adott hibridcsaládban?

A vizsgált hibridcsaládok felmérése során megállapítottam, hogy a 'Flame Seedless' és 'Palatina' fajták egyaránt tartalmazzak egy-egy *SCC8* null allélt, meghatároztam a nevezett fajták pontos *SCC8* genotípusát: *SCC8*⁺/0, illetve *scc8*⁻/0. Az ifj. KOZMA PÁL nemesítési programjában rendszeresen használt BC₄ multirezisztens fajhibrid esetében bizonyítottam egy rekombináns *SCC8*⁺ és egy null allél jelenlétét.

A magvatlanságért felelős domináns inhibitor *SdI* gén mellett a sztenospermokarp magvatlanság kialakulását további recesszív gének is befolyásolják. Az *SdI* allél jelenléte szükséges feltétele ugyan a sztenospermokarpia kialakulásának, ám nem minden esetben elégséges a fogyasztó szemszögéből magvatlannak tekinthető bogyók kialakulásához, ehhez további recesszív gének jelenléte is szükséges. Eredményeim a marker alkalmazhatóságát bizonyítják a vizsgált utódnemzedékekben, ám más kombinációk esetében a marker felhasználhatóságát igazolni kell.

Munkám során bebizonyosodott, hogy az irodalomban közölt *SCC8* primerek nem csak a magfejlődés inhibitor *SdI* lókuszt hordozó 18., hanem a szőlő 4. és 19. kapcsoltsági csoportjáról is felszaporít(hat)nak egy közel 1 kb hosszúságú szakaszt. A három, *SCC8* primerekkel felszaporítható közel azonos méretű 'Pinot noir' lókuszt jelenléte újabb bizonyítéka lehet a kerti szőlő hexaploid eredetének. Az *SCC8* marker továbbfejlesztéséhez új primereket terveztem, amelyek szelektívek a szőlő sztenospermokarp magvatlanságának domináns *SdI* inhibitor génjét hordozó kromoszóma-szakaszra a 18. kapcsoltsági csoporton, és továbbra is alkalmasak az *sdl* gén markerezésére.

8. Irodalomjegyzék

1. ADAM-BLONDON, A. F., F. LAHOUGE-ESNAULT, A. BOUQUET, J. M. BOURSIQUOT és P. THIS (2001): Usefulness of two SCAR markers for marker-assisted selection of seedless grapevine cultivar. *Vitis*, 40 (3): 147–155.
2. ADAMS, K. L. és J. F. WENDEL (2005): Polyploidy and genome evolution in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 8 (2): 135–41.
3. AGÜERO, C., C. RIQUELME és R. TIZIO (1995): Embryo rescue from seedless grapevines (*Vitis vinifera* L.) treated with growth retardants. *Vitis*, 34 (2): 73–76.
4. AGUILAR, F. J., J. A. ROSSELLO és N. G. FELINER (1999): Nuclear ribosomal DNA (nrDNA) concerted evolution in natural and artificial hybrids of *Armeria* (*Plumbaginaceae*). *Molecular Ecology*, 8 (8): 1341–1346.
5. AGUIRRE, G. U., G. M. CIUFFO és L. E. C. CIUFFO (2009): Genetic differentiation of *Rosa rubiginosa* L. in two different Argentinean ecoregions. *Plant Systematics and Evolution*, 281 (1–4): 183–192.
6. ALLEWELDT, G. és E. DETTWEILER (1994): *The Genetic Resources of Vitis: World List of Grapevine Collections*. Geilweilerhof, 2nd kiadás.
7. ALLEWELDT, G. és J. POSSINGHAM (1988): Progress in grapevine breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 75 (5): 669–673.
8. ÁLVAREZ, I. (2003): Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29 (3): 417–434.
9. ATIENZA, S. G., A. M. TORRES, T. MILLÁN és J. I. CUBERO (2005): Genetic Diversity in *Rosa* as Revealed by RAPDs. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 70 (3): 75–85.
10. BABAEI, A., S. R. TABAEI-AGHDAEI, M. KHOSH-KHUI, R. OMIDBAIGI, M. R. NAGHAVI, G. D. ESSELINK és M. J. M. SMULDERS (2007): Microsatellite analysis of Damask rose (*Rosa damascena* MILL.) accessions from various regions in Iran reveals multiple genotypes. *BMC Plant Biology*, 7 (12): 1–6.
11. BAKONYI, K. és L. BAKONYI (2002): History and results of rootstock breeding in Hungary. *International Journal of Horticultural Science*, 8 (1): 13–17.
12. BALDWIN, B. (1992): Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: An example from the *Compositae*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1 (1): 3–16.

13. BARCELÓ, A. R., J. M. ZAPATA és A. A. CALDERÓN (1996): A basic peroxidase isoenzyme, marker of resistance against *Plasmopara viticola* in grapevines, is induced by an elicitor from *Trichoderma viride* in susceptible grapevines. *Journal of Phytopathology*, 144 (6): 309–313.
14. BARLASS, M., D. W. RAMMING és H. P. DAVIS (1988): *In-ovulo* embryo culture: a breeding technique to rescue seedless × seedless table grape crosses. *Australian Grapegrower and Winemaker*, 292: 123–125.
15. BATTAGLIA, R., V. BRAMBILLA, L. COLOMBO, A. R. STUITJE és M. M. KATER (2006): Functional analysis of MADS-box genes controlling ovule development in *Arabidopsis* using the ethanol-inducible *alc* gene-expression system. *Mechanisms of Development*, 123 (4): 267–276.
16. BAYDAR, N. G., H. BAYDAR és T. DEBENER (2004): Analysis of genetic relationships among *Rosa damascena* plants grown in Turkey by using AFLP and microsatellite markers. *Journal of Biotechnology*, 111 (3): 263–267.
17. BENHAM, J. J. (2001): Genographer. <http://hordeum.oscs.montana.edu/genographer>.
18. BÉNYEI, F., A. LŐRINCZ és L. SZ. NAGY (szerk.) (1999): *Szőlőtermesztés*. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 3. kiadás, 435 pp.
19. BERTOVIÁ, L. (1992): *Angiospermophytina, Dicotyledonopsida, Rosales*. In: *Flóra Slovenska IV/3*, Vedom vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied, Pozsony. pp. 43,64–66.
20. BISZTRAY, GY. és I. VELICH (1999): Molekuláris markerezési eljárások kertészeti növényeknél. In: M. H. NOVÁK (szerk.), *Genetikai variabilitás a növénynevelésben*, Mezőgazda, Budapest. pp. 61–65.
21. BISZTRAY, GY. D., T. DEÁK, ZS. SEREGÉLY és K. KAFFKA (2006): NIR Spectroscopy for distinction of horticultural plant species. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 725: 709–712.
22. BODOR, P., M. HÖHN, A. PEDRYC, T. DEÁK, I. DÜCSŐ, I. UZUN, É. I. BÖHM, K. CSEKE és GY. D. BISZTRAY (2010): Conservation value of the native Hungarian wild grape (*Vitis sylvestris* GMEL.) evaluated by microsatellite markers. *Vitis*, 49 (1): 23–27.
23. BONIN, A., D. EHRICH és S. MANEL (2007): Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular Ecology*, 16 (18): 3737–3758.
24. BORBÁS, V. (1880): A Magyar Birodalom vadon termő rózsái monographiájának kísérlete – *Primitiae monographia Rosarum imperii Hungarici*. MTA Matematikai és Természettudományi Közlemények: 305–506.
25. BOSS, P., E. SENSI, C. HUA, C. DAVIES és M. R. THOMAS (2002): Cloning and characterisation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) MADS-box genes expressed during inflorescence and berry development. *Plant Science*, 162 (6): 887–895.

-
26. BOTSTEIN, D., R. L. WHITE, M. SKOLNICK és R. W. DAVIS (1980): Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32 (3): 314–331.
27. BOUQUET, A. és Y. DANGLLOT (1996): Inheritance of seedlessness in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*, 35 (1): 35–42.
28. BOUQUET, A., J. PAUQUET, A. F. ADAM-BLONDON, L. TORREGOSA, D. MERDINOGLU és S. WIEDEMANN-MERDINOGLU (2000): Towards the obtention of grapevine varieties resistant to powdery and downy mildews by conventional breeding and biotechnology. *Bulletin de l'OIV*, 833–834: 445–452.
29. BOURSQUOT, J. M. (szerk.) (2007): *Catalogue des variétés et clones de vigne cultivés en France*. Institut Français de la Vigne et du Vin, CBE Production, Montpellier, 2 kiadás, 455 pp.
30. BREMER, B., K. BREMER, M. W. CHASE, J. L. REVEAL, D. E. SOLTIS, P. S. SOLTIS, P. F. STEVENS, A. A. ANDERBERG, M. F. FAY, P. GOLDBLATT, W. S. JUDD, M. KÄLLERSJÖ, J. KÅREHED, K. A. KRON, J. LUNDBERG, D. L. NICKRENT, R. G. OLMSTEAD, B. OXELMAN, J. C. PIRES, J. E. RODMAN, P. J. RUDALL, V. SAVOLAINEN, K. J. SYTSMA, M. VAN DER BANK, K. WURDACK, J. Q. Y. XIANG és S. ZMARZTY (2003): An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141 (4): 399–436.
31. BREMER, B., K. BREMER, M. W. CHASE, M. F. FAY, J. L. REVEAL, D. E. SOLTIS, P. S. SOLTIS, P. F. STEVENS, A. A. ANDERBERG, M. J. MOORE, R. G. OLMSTEAD, P. J. RUDALL, K. J. SYTSMA, D. C. TANK, K. WURDACK, J. Q.-Y. XIANG és S. ZMARZTY (2009): An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161 (2): 105–121.
32. BRUNEAU, A., J. R. STARR és S. JOLY (2007): Phylogenetic relationships in the genus *Rosa*: New evidence from chloroplast DNA sequences and an appraisal of current knowledge. *Systematic Botany*, 32 (2): 366–378.
33. BRYANT, D. és V. MOULTON (2004): Neighbor-net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Molecular Biology and Evolution*, 21 (2): 255–265.
34. BUDAHN, H., H. PETERKA, M. A. A. MOUSA, Y. DING, S. ZHANG és J. LI (2009): Molecular mapping in oil radish (*Raphanus sativus* L.) and QTL analysis of resistance against beet cyst nematode (*Heterodera schachtii*). *Theoretical and Applied Genetics*, 118 (4): 775–782.
35. CABEZAS, J. A., M. T. CERVERA, L. RUIZ-GARCÍA, J. CARREÑO és J. M. MARTÍNEZ-ZAPATER (2006): A genetic analysis of seed and berry weight in grapevine. *Genome*, 49 (12): 1572–1585.
36. CAIN, D. W., R. L. EMERSHAD és R. E. TARAİLO (1983): *In-ovulo* embryo culture and seedling development of seeded and seedless grapes (*Vitis vinifera* L.). *Vitis*, 22: 9–14.
-

37. CHASE, M. W., N. SALAMIN, M. WILKINSON, J. M. DUNWELL, R. P. KESANAKURTHI, N. HAIDAR és V. SAVOLAINEN (2005): Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society London, B, Biological Sciences*, 360 (1462): 1889–1895.
38. CHEN, Z., H. A. HARTMANN, M.-J. WU, E. J. FRIEDMAN, J.-G. CHEN, M. PULLEY, P. SCHULZE-LEFERT, R. PANSTRUGA és A. M. JONES (2006): Expression analysis of the AtMLO gene family encoding plant-specific seven-transmembrane domain proteins. *Plant Molecular Biology*, 60 (4): 583–597.
39. DE COCK, K., K. VAN DER MIJNSBRUGGE, P. BREYNE, E. VAN BOCKSTAELE és J. VAN SLYCKEN (2008): Morphological and AFLP-based differentiation within the taxonomical complex section *Caninae* (subgenus *Rosa*). *Annals of Botany*, 102 (5): 685–697.
40. COMAI, L. (2005): The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Reviews Genetics*, 6 (11): 836–846.
41. CONDIT, R. és S. P. HUBBELL (1991): Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome*, 34 (1): 66–71.
42. CONSTANTINESCU, G. A., A. PENA és A. INDREAS (1972): Inheritance of some qualitative and quantitative characters in the progeny of crosses between functionally female (gynodynamic) and apyrene (androdynamic) varieties [románul]. *Probl. Genet. Teoret. Appl.*, 7: 213–241.
43. COSTANTINI, L., J. BATTILANA, F. LAMAJ, G. F. EMAIL és M. S. GRANDO (2008): Berry and phenology-related traits in grapevine (*Vitis vinifera* L.): From Quantitative Trait Loci to underlying genes. *BMC Plant Biology*, 8 (1): 38–54.
44. CRESPEL, L., M. CHIROLLET, E. DUREL, D. ZHANG, J. MEYNET és S. GUDIN (2002): Mapping of qualitative and quantitative phenotypic traits in *Rosa* using AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 105 (8): 1207–1214.
45. CSEPREGI, P. és J. ZILAI (1988): *Szőlőfajta-ismeret és -használat*. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest, 508 pp.
46. CSERGŐ, A.-M., P. SCHÖNSWETTER, G. MARA, T. DEÁK, N. BOŞCAIU és M. HÖHN (2009): Genetic structure of peripheral, island-like populations: a case study of *Saponaria bellidifolia* SM. (Caryophyllaceae) from the Southeastern Carpathians. *Plant Systematics and Evolution*, 278 (1–2): 33–41.
47. DAKIN, E. E. és J. C. AVISE (2004): Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93 (5): 504–509.
48. DARLINGTON, C. D. és A. P. WYLIE (szerk.) (1955): *Chromosome atlas of flowering plants*, kötet 519. Allen and Unwin, London, 2 kiadás.
49. DASS, H. C. és G. S. RANDHAWA (1968): Effect of gibberellin on seeded *Vitis vinifera* with special reference to induction of seedlessness. *Vitis*, 7 (1): 10–21.

-
50. DEBENER, T. és L. MATTIESCH (1999): Construction of a genetic linkage map for roses using RAPD and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 99 (5): 891–899.
51. DEBENER, T., C. BARTELS és L. MATTIESCH (1996): RAPD analysis of genetic variation between a group of rose cultivars and selected wild rose species. *Molecular Breeding*, 2 (4): 321–327.
52. DEBENER, T., T. JANAKIRAM és L. MATTIESCH (2000): Sports and seedlings of rose varieties analysed with molecular markers. *Plant Breeding*, 119 (1): 71–74.
53. DETTWEILER, E., A. JUNG, E. ZYPRIAN és R. TÖPFER (2000): Grapevine cultivar Müller-Thurgau and its true type descent. *Vitis*, 29 (2): 63–65.
54. DOLIGEZ, A., A. BOUQUET, Y. DANGLLOT, F. LAHOGUE, S. RIAZ, C. MEREDITH, K. EDWARDS és P. THIS (2002): Genetic mapping of grapevine (*Vitis vinifera* L.) applied to the detection of QTLs for seedlessness and berry weight. *Theoretical and Applied Genetics*, 105 (5): 780–795.
55. DOLIGEZ, A., A. F. ADAM-BLONDON, G. CIPRIANI, G. DI GASPERO, V. LAUCOU, D. MERDINOGLU, C. P. MEREDITH, S. RIAZ, C. ROUX és P. THIS (2006): An integrated SSR map of grapevine based on five mapping populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 113 (3): 369–82.
56. DON, R. H., P. T. COX, B. J. WAINWRIGHT, K. BAKER és J. S. MATTICK (1991): 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Research*, 19 (14): 4008.
57. DRAY, S. és A. DUFOUR (2007): The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software*, 22 (1): 1–20.
58. DUGO, M. L., Z. SATOVIC, T. MILLÁN, J. I. CUBERO, D. RUBIALES, A. CABRERA és A. M. TORRES (2005): Genetic mapping of QTLs controlling horticultural traits in diploid roses. *Theoretical and Applied Genetics*, 111 (3): 511–520.
59. EBADI, A., J. MOGHADAM és R. FATAHI (2009): Evaluation of 22 populations achieved from controlled crossing between some seeded×seedless grapevine cultivars. *Scientia Horticulturae*, 119 (4): 371–376.
60. EMADPOUR, M., R. HOSSEINI és E. BEIRAMIZADEH (2009): A high genetic diversity revealed between commercial rose cultivars by RAPDR-PCR technique. *International Journal of Plant Production*, 3 (4): 61–66.
61. ESSELINK, G. D., M. J. M. SMULDERS és B. VOSMAN (2003): Identification of cut rose (*Rosa hybrida*) and rootstock varieties using robust sequence tagged microsatellite site markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 106 (2): 277–286.
62. ESSELINK, G. D., H. NYBOM és B. VOSMAN (2004): Assignment of allelic configuration in polyploids using the MAC-PR (microsatellite DNA allele counting-peak ratios) method. *Theoretical and Applied Genetics*, 109 (2): 402–408.
-

63. EXCOFFIER, L. és H. E. L. LISCHER (2010): Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, in press.
64. FACSAR, G. (1980): Addenda et corrigenda at tromos I-V. Appendix. In: R. SOÓ (szerk.), *Synopsis systematico-geobotanica florum vegetationisque Hungariae*, Akadémiai Kiadó, Budapest, kötet 6. pp. 53–55, 166–170, 177.
65. FACSAR, G. (1993): Magyarország vadontermő rózsái. *KÉE Közleményei, Publicationes Universitatis Horticulturae Industriaeque Alimentariae*, 53: 75–121.
66. FACSAR, G. (2002): A small country with many *Rosa* species? In: É. SALAMON-ALBERT (szerk.), *Hungarian Botanic Research at the Millennium*, PTE, Pécs, Hungary. pp. 141–155.
67. FACSAR, G. (2004): Taxonomic interpretation of the natural diversity of the genus *Rosa* in the Carpathian Basin. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 690: 35–44.
68. FACSAR, G., J. MALECZKA és R. POPEK (1989): Cytotaxonomy of formal groups of *Rosa gallica* L. and *Rosa livescens* BESS. in Hungary and the neighbouring countries. *Publicationes Universitatis Horticulturae Industriaeque Alimentariae*, 52: 125–135.
69. FACSAR, G., R. POPEK és J. MALECZKA (1991): Taxonomisch-karyologische Untersuchungen an wilden Rosen aus Ungarn und anderen europäischen Länder. *Fragm. Flor. Geobot.*, 36: 293–300.
70. FANIZZA, G., F. LAMAJ, L. COSTANTINI, R. CHAABANE és M. S. GRANDO (2005): QTL analysis for fruit yield components in table grapes (*Vitis vinifera*). *Theoretical and Applied Genetics*, 111 (4): 658–664.
71. FARRIS, J. S. (1970): Methods for Computing Wagner Trees. *Systematic Zoology*, 19 (1): 83–92.
72. FELSENSTEIN, J. (1981): Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17 (6): 368–376.
73. FELSENSTEIN, J. (1989): PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics*, 5 (2): 164–166.
74. FIALOWSKI, L. (1897): Rózsa. In: L. GERŐ (szerk.), *A Pallas Nagy Lexikona*, Pallas Irodalmi és Nyomdai Rt., Budapest, kötet 14. pp. 717–720.
75. FITCH, W. M. (1971): Toward defining the course of evolution: Minimum change for a specific tree topology. *Systematic Zoology*, 20 (4): 406–416.
76. GALBÁCS, Z., S. MOLNÁR, G. HALÁSZ, P. KOZMA IFF., S. HOFFMANN, L. KOVACS, A. VERES, Z. GALLI, A. SZŐKE, L. HESZKY és E. KISS (2009): Identification of grapevine cultivars using microsatellite-based DNA barcodes. *Vitis*, 48 (1): 17–24.
77. GEHRKE, B., C. BRÄUCHLER, K. ROMOLEROUX, M. LUNDBERG, G. HEUBL és T. ERIKSSON (2008): Molecular phylogenetics of *Alchemilla*, *Aphanes* and *Lachemilla* (*Rosaceae*) inferred from plastid and nuclear intron and spacer DNA sequences, with

-
- comments on generic classification. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47 (3): 1030–1044.
78. GILCHRIST, E. J., G. W. HAUGHN, C. C. YING, S. P. OTTO, J. ZHUANG, D. CHEUNG, B. HAMBERGER, F. ABOUTORABI, T. KALYNYAK, L. JOHNSON, J. BOHLMANN, B. E. ELLIS, C. J. DOUGLAS és Q. C. B. CRONK (2006): Use of Ecotilling as an efficient SNP discovery tool to survey genetic variation in wild populations of *Populus trichocarpa*. *Molecular Ecology*, 15 (5): 1367–1378.
79. GRANGER, A. R., G. R. CLARKE és J. F. JACKSON (1993): Sweet cherry cultivar identification by leaf isozyme polymorphism. *Theoretical and Applied Genetics*, 86 (4): 458–464.
80. GUO, W., T. ZHANG, X. SHEN, J. Z. YU és R. J. KOHEL (2003): Development of SCAR marker linked to a major QTL for high fiber strength and its usage in molecular-marker assisted selection in upland cotton. *Crop Science*, 43 (6): 2252–2256.
81. GYÖRFFYNÉ JAHNKE, G. (2006): A szőlőnemesítés hatékonyságának növelése a faj genetikai hátterének vizsgálatával. Ph.D. thesis, Interdiszciplináris Agrártudományok Doktori Iskola, Budapest.
82. HAJDU, E. (2002): Table grape (*Vitis vinifera* L.) breeding and results in Hungary. *International Journal of Horticultural Science*, 8 (1): 25–29.
83. HAJDU, E. (2003): *Magyar szőlőfajták*. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 258 pp.
84. HANANIA, U., M. VELCHEVA, E. OR, M. FLAISHMAN, N. SAHAR és A. PERL (2007): Silencing of chaperonin 21, that was differentially expressed in inflorescence of seedless and seeded grapes, promoted seed abortion in tobacco and tomato fruits. *Transgenic Research*, 16 (4): 515–525.
85. HANANIA, U., M. VELCHEVA, N. SAHAR, M. FLAISHMAN, E. OR, O. DEGANI és A. PERL (2009): The ubiquitin extension protein S27a is differentially expressed in developing flower organs of Thompson seedless versus Thompson seeded grape isogenic clones. *Plant Cell Reports*, 28 (7): 1033–1042.
86. HEBERT, P. D. N., GREGORY és T. RYAN (2005): The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*, 54 (5): 852–859.
87. HÖHN, M., F. GUGERLI, P. ABRAN, GY. BISZTRAY, A. BUONAMICI, K. CSEKE, L. HUFNAGEL, C. QUINTELA-SABARÍS, F. SEBASTIANI és G. G. VENDRAMIN (2009): Variation in the chloroplast DNA of Swiss stone pine (*Pinus cembra* L.) reflects contrasting post-glacial history of populations from the Carpathians and the Alps. *Journal of Biogeography*, 36 (9): 1798–1806.
88. HOLLINGSWORTH, P. M., L. L. FORREST, J. L. SPOUGE, M. HAJIBABAEI, S. RATNASINGHAM, M. VAN DER BANK, M. W. CHASE, R. S. COWAN, D. L. ERICKSON, A. J. FAZEKAS, S. W. GRAHAM, K. E. JAMES, K. J. KIM, W. J. KRESS, H. SCHNEIDER, J. VAN ALPHENSTAHL, S. C. H. BARRETT, C. VAN DEN BERG, D. BOGARIN, K. S. BURGESS, K. M. CAMERON, M. CARINE, J. CHACON, A. CLARK, J. J. CLARKSON,
-

- F. CONRAD, D. S. DEVEY, C. S. FORD, T. A. J. HEDDERSON, M. L. HOLLINGSWORTH, B. C. HUSBAND, L. J. KELLY, P. R. KESANAKURTI, J. S. KIM, Y. D. KIM, R. LAHAYE, H. L. LEE, D. G. LONG, S. MADRINAN, O. MAURIN, I. MEUSNIER, S. G. NEWMASER, C. W. PARK, D. M. PERCY, G. PETERSEN, J. E. RICHARDSON, G. A. SALAZAR, V. SAVOLAINEN, O. SEBERG, M. J. WILKINSON, D. K. YI, D. P. LITTLE és CBOL PLANT WORKING GROUP (2009): A DNA barcode for land plants. *PNAS*, 106 (31): 12794–12797.
89. HUBBARD, M., J. KELLY, S. RAJAPAKSE, A. ABBOTT és R. BALLARD (1992): Restriction fragment length polymorphisms in rose and their use for cultivar identification. *HortScience*, 27 (2): 172–173.
90. HUSON, D. H. és D. BRYANT (2006): Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23 (2): 254–267.
91. HUSON, D. H. és T. H. KLOEPPER (2005): Computing recombination networks from binary sequences. *Bioinformatics*, 21 (Suppl 2): ii159–165.
92. HUSON, D. H., D. C. RICHTER, C. RAUSCH, T. DEZULIAN, M. FRANZ és R. RUPP (2007): Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics*, 8: 460–465.
93. HUSON, D. H., R. RUPP, V. BERRY, P. GAMBETTE és C. PAUL (2009): Computing galled networks from real data. *Bioinformatics*, 25 (12): 85–93.
94. IBANEZ, J., A. M. VARGAS, M. PALANCA, J. BORREGO és M. T. DE ANDRES (2009): Genetic relationships among table-grape varieties. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60 (1): 35–42.
95. IKEDA, F., K. ISHIKAWA, S. YAZAWA és T. BABA (2004): Induction of compact clusters with large seedless berries in the grape cultivar Fujimori by the use of streptomycin, gibberellins, and CPPU. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 640: 361–368.
96. IWATA, H., T. KATO és S. OHNO (2000): Triparental origin of Damask roses. *Gene*, 259 (1–2): 53–59.
97. JACOB, Y., C. TEYSSIER, S. C. BROWN és S. REYNDERS-ALOISI (1996): Use of flow cytometry for the rapid determination of ploidy level in the genus *Rosa*. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 424: 273–278.
98. JAILLON, O., J.-M. AURY, B. NOEL, A. POLICRITI, C. CLEPET, A. CASAGRANDE, N. CHOISNE, S. AUBOURG, N. VITULO, C. JUBIN, A. VEZZI, F. LEGEAI, P. HUGUENEY, C. DASILVA, D. HORNER, E. MICA, D. JUBLOT, J. POULAIN, C. BRUYÈRE, A. BILLAULT, B. SEGURENS, M. GOUYVENOUX, E. UGARTE, F. CATTONARO, V. ANTHOUARD, V. VICO, C. DEL FABBRO, M. ALAUX, G. DI GASPERO, V. DUMAS, N. FELICE, S. PAILLARD, I. JUMAN, M. MOROLDO, S. SCALABRIN, A. CANAGUIER, I. LE CLAINCHE, G. MALACRIDA, E. DURAND, G. PESOLE, V. LAUCOU, P. CHATELET, D. MERDINOGLU, M. DELLEDONNE, M. PEZZOTTI, A. LECHARNY, C. SCARPELLI, F. ARTIGUENAVE, M. E. PÈ, G. VALLE, M. MORGANTE, M. CABOCHE, A.-F. ADAM-BLONDON, J. WEISSENBACH, F. QUÉTIER és P. WINCKER (2007): The grapevine

-
- genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, 449 (7161): 463–467.
99. JAN, C. H., D. H. BYRNE, J. MANHART és H. WILSON (1999): Rose germplasm analysis with RAPD markers. *HortScience*, 34 (2): 341–345.
100. JANSEN, R. C., H. GEERLINGS, A. J. V. OEVEREN és R. C. V. SCHAİK (2000): A comment on codominant scoring of AFLP markers. *Genetics*, 158 (3): 1459–1468.
101. JENSEN, S. (2002): Chemotaxonomy of the *Oleaceae*: iridoids as taxonomic markers. *Phytochemistry*, 60 (3): 213–231.
102. JEPPESEN, M. G., P. ORTIZ, W. SHEPARD, T. G. KINZY, J. NYBORG és G. R. ANDERSEN (2003): The crystal structure of the glutathione S-transferase-like domain of elongation factor 1Bgamma from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (47): 47190–47198.
103. JOLY, S. és A. BRUNEAU (2006): Incorporating allelic variation for reconstructing the evolutionary history of organisms from multiple genes: An example from *Rosa* in north America. *Systematic Biology*, 55 (4): 623–636.
104. JOLY, S., J. R. STARR, W. H. LEWIS és A. BRUNEAU (2006): Polyploid and hybrid evolution in roses east of the Rocky Mountains. *American Journal of Botany*, 93 (3): 412–425.
105. JONES, C., K. EDWARDS, S. CASTAGLIONE, M. WINFIELD, F. SALA, C. VAN DE WIEL, G. BREDEMEIJER, B. VOSMAN, M. MATTHES, A. DALY, R. BRETTSCHEIDER, P. BETTINI, M. BUIATTI, E. MAESTRI, A. MALCEVSCHI, N. MARMIROLI, R. AERT, G. VOLCKAERT, J. RUEDA, R. LINACERO, A. VAZQUEZ és A. KARP (1997): Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular Breeding*, 3 (5): 381–390.
106. JÜRGENS, A. H., B. SEITZ és I. KOWARIK (2007): Genetic differentiation of *R. canina* (L.) at regional and continental scales. *Plant systematics and Evolution*, 269 (1–2): 39–53.
107. KERÉNYI-NAGY, V. (2006): *A Rosa L. genusról és a Rosa sancti-andreae* DEG. et TRTRM. ex JÁV. új populációjának felfedezéséről. Tudományos Diákköri Dolgozat, Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar, 50 pp.
108. KIM, S. W., S. R. MIN, J. KIM, S. K. PARK, T. I. KIM és J. R. LIU (2009): Rapid discrimination of commercial strawberry cultivars using Fourier transform infrared spectroscopy data combined by multivariate analysis. *Plant Biotechnology Reports*, 3 (1): 87–93.
109. KIM, Y. és D. H. BYRNE (1996): Interspecific hybrid verification of *Rosa* with isozymes. *HortScience*, 31 (7): 1207–1209.
110. KIM, Y.-D., S.-H. KIM és L. R. LANDRUM (2004): Taxonomic and phytogeographic implications from ITS phylogeny in *Berberis* (Berberidaceae). *Journal of Plant Research*, 117 (3): 175–182.
-

111. KISS, E., P. KOZMA IFJ., G. HALÁSZ, A. VERES, Z. GALLI, A. SZŐKE, S. HOFFMANN, S. MOLNÁR, A. BALOGH és L. HESZKY (2005): Microsatellite based fingerprints and pedigree analysis of grapevine of Carpathian Basin origin. *Proceedings of the Grape Genomics Symposium, St. Louis, Missouri, USA*: 79–87.
112. KISS, E., P. KOZMA IFJ., G. HALÁSZ, S. MOLNÁR, Z. GALBÁCS, S. HOFFMANN, A. VERES, Z. GALLI, A. SZŐKE és L. HESZKY (2009): Pedigree of Carpathian and Hungarian grapevine cultivars based on microsatellite analysis. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 827: 221–224.
113. KLÁŠTERSKÁ, I. (1969): Cytologie and some chromosome numbers of Czechoslovak Roses I. *Folia Geobotanica et Phytotaxonomica*, 4: 175–189.
114. KLÁŠTERSKÁ, I. és I. KLÁŠTERSKÝ (1974): Cytologie and some chromosome numbers of Czechoslovak Roses II. *Botaniške Notiŝer*, 127: 328–337.
115. KOCH, M. A., C. DOBES és T. MITCHELL-OLDS (2003): Multiple hybrid formation in natural populations: Concerted evolution of the internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA (ITS) in North American *Arabis divaricarpa* (*Brassicaceae*). *Molecular Biology and Evolution*, 20 (3): 338–350.
116. KOOPMAN, W. J. M. (2005): Phylogenetic signal in AFLP data sets. *Systematic Biology*, 54 (2): 197–217.
117. KOOPMAN, W. J. M. és G. GORT (2004): Significance tests and weighted values for AFLP similarities, based on *Arabidopsis in silico* AFLP fragment length distributions. *Genetics*, 167 (4): 1915–1928.
118. KOOPMAN, W. J. M., V. WISSEMAN, K. DE COCK, J. VAN HUYLENBROECK, J. DE RIEK, G. J. H. SABATINO, D. VISSER, B. VOSMAN, C. M. RITZ, B. MAES, G. WERLEMARK, H. NYBOM, T. DEBENER, M. LINDE és M. J. M. SMULDERS (2008): AFLP markers as a tool to reconstruct complex relationships: A case study in *Rosa* (*Rosaceae*). *American Journal of Botany*, 95 (3): 343–366.
119. KORKUTAL, I. (2005): Embryo abortion in some new seedless table grape (*Vitis vinifera* L.) varieties. *International Journal of Botany*, 1 (1): 1–4.
120. KÖRPÁS, A., M. BARÁNEK, M. PIDRA és J. HRADLIK (2009): Behaviour of two SCAR markers for seedlessness within Central European varieties of grapevine. *Vitis*, 48 (1): 33–42.
121. KOVARIK, A., G. WERLEMARK, A. R. LEITCH, K. SOUCKOVA-SKALICKA, Y. K. LIM, L. KHAITOVÁ, B. KOUKALOVA és H. NYBOM (2008): The asymmetric meiosis in pentaploid dogroses (*Rosa* sect. *Caninae*) is associated with a skewed distribution of rRNA gene families in the gametes. *Heredity*, 101 (4): 359–367.
122. IFJ. KOZMA, P. (2002): Goals and methods in grape resistance breeding in Hungary. *International Journal of Horticultural Science*, 8 (1): 41–46.
123. IFJ. KOZMA, P., A. BALOGH, E. KISS, Z. GALLI, T. KONCZ és L. HESZKY (2003): Study of origin of cultivar 'Csaba Gyöngye' (Pearl of Csaba). *Acta Horticulturae (ISHS)*, 603: 585–591.

-
124. KRAUSS, S. L. (2000): Accurate gene diversity estimates from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Molecular Ecology*, 9 (9): 1241–1245.
125. KRESS, W. J., K. J. WURDACK, E. A. ZIMMER, L. A. WEIGT és D. H. JANZEN (2005): Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *PNAS*, 102 (23): 8369–8374.
126. KRUSKAL, J. B. (1964): Nonmetric multidimensional scaling: A numerical method. *Psychometrika*, 29 (2): 115–129.
127. KUMAR, A. M., K. REDDY, L. SIMON és Y. L. RAMACHANDRA (2009): RAPD analysis of local bell pepper genotypes in relation with powdery mildew incidence and fruit yield: Managing disease by single chemical molecule. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 42 (9): 891–901.
128. KUNG, C. C. S., W. N. HUANG, Y. C. HUANG és K. C. YEH (2006): Proteomic survey of copper-binding proteins in *Arabidopsis* roots by immobilized metal affinity chromatography and mass spectrometry. *Proteomics*, 6 (9): 2746–2758.
129. LACAPE, J. M., J. JACOBS, T. ARIOLI, R. DERIJCKER, N. FORESTIER-CHIRON, D. LLEWELLYN, J. JEAN, E. THOMAS és C. VIOT (2009): A new interspecific, *Gossypium hirsutum* × *G. barbadense*, RIL population: towards a unified consensus linkage map of tetraploid cotton. *Theoretical and Applied Genetics*, 119 (2): 281–292.
130. LAHOUE, F., P. THIS és A. BOUQUET (1998): Identification of a codominant SCAR marker linked to the seedlessness character in grapevine. *Theoretical and Applied Genetics*, 97 (5-6): 950–959.
131. LEDBETTER, C. A. és D. W. RAMMING (1989): Seedlessness in grapes. *Horticultural Reviews*, 11: 159–184.
132. LEDBETTER, C. A., és L. BURGOS (1994): Inheritance of stenospermocarpic seedlessness in *Vitis vinifera* L. *Journal of Heredity*, 85 (2): 157–160.
133. LI, Z. T., S. A. DHEKNEY és D. J. GRAY (2009): Molecular characterization of a SCAR marker purportedly linked to seedlessness in grapevine (*Vitis*). *Molecular Breeding*, Online first 15. December.
134. LIEBHARD, R., B. KOLLER, L. GIANFRANCESCHI és C. GESSLER (2003): Creating a saturated reference map for the apple (*Malus* × *domestica* BORKH.) genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 106 (8): 1497–1508.
135. LIM, K. Y., G. WERLEMARK, R. MATYASEK, J. B. BRINGLOE, V. SIEBER, H. EL MOKADEM, J. MEYNET, J. HEMMING, A. R. LEITCH és A. V. ROBERTS (2005): Evolutionary implications of permanent odd polyploidy in the stable sexual, pentaploid of *Rosa canina* L. *Heredity*, 94 (5): 501–506.
136. LINNÈ, C. v. (1753): *Caroli Linnaei ... Species plantarum*, kötet 1. Holmiae: Impensis Laurentii Salvii, 572 pp.
-

137. LITT, M. és J. A. LUTY (1989): A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44 (3): 397–401.
138. LOOMIS, N. H. és J. H. WEINBERGER (1979): Inheritance studies of seedlessness in grapes. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 104: 181–184.
139. LOUGHEED, S. C., H. L. GIBBS, K. A. PRIOR és P. J. WEATHERHEAD (2000): A comparison of RAPD versus microsatellite DNA markers in population studies of the Massasauga rattlesnake. *Journal of Heredity*, 91 (6): 458–463.
140. LUO, R. és B. LARGET (2009): Modeling substitution and indel processes for AFLP marker evolution and phylogenetic inference. *Annals of Applied Statistics*, 3 (1): 222–248.
141. LUO, R., A. L. HIPPEL és B. LARGET (2007): A Bayesian model of AFLP marker evolution and phylogenetic inference. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 6 (1): 11.
142. MALECZKA, J., R. POPEK és G. FACSAR (1990): Cyto-taxonomical studies in the genus *Rosa* L. the representatives from Hungary. *Acta Biologica Cracoviensis*, 32: 189–196.
143. MASTERSON, J. (1994): Stomatal size in fossil plants – Evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science*, 264 (5157): 421–424.
144. MATSUMOTO, E., C. YASUI, M. OHI és M. TSUKADA (1998a): Linkage analysis of RFLP markers for clubroot resistance and pigmentation in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Euphytica*, 104 (2): 79–86.
145. MATSUMOTO, S. és H. FUKUI (1996): Identification of rose cultivars and clonal plants by random amplified polymorphic DNA. *Scientia Horticulturae*, 67 (1–2): 49–54.
146. MATSUMOTO, S., H. WAKITA és H. FUKUI (1997): Molecular classification of wild roses using organelle DNA probes. *Scientia Horticulturae*, 68 (1–4): 191–196.
147. MATSUMOTO, S., M. KOUCHI, J. YABUKI, M. KUSUNOKI, Y. UEDA és H. FUKUI (1998b): Phylogenetic analysis of the genus *Rosa* using the matK sequence: molecular evidence for the narrow genetic background of modern roses. *Scientia Horticulturae*, 77: 73–82.
148. MCGOVERN, P. E. (2004): *Ancient wine: the search for the origins of viniculture*. Princeton University Press, Princeton, 400 pp.
149. MEJÍA, N. és P. HINRICHSSEN (2003): A new, highly assertive SCAR marker potentially useful to assist selection for seedlessness in table grape breeding. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 603: 559–564.
150. MEJÍA, N., M. GEBAUER, L. MUÑOZ, N. HEWSTONE, C. MUÑOZ és P. HINRICHSSEN (2007): Identification of QTLs for seedlessness, berry size, and ripening date in a seedless × seedless table grape progeny. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58 (4): 499–507.

-
151. MILLAN, T., F. OSUNA, S. COBOS, A. M. TORRES és J. I. CUBERO (1996): Using RAPDs to study phylogenetic relationships in *Rosa*. *Theoretical and Applied Genetics*, 92 (2): 273–277.
152. MOURY, B., S. PFLIEGER, A. BLATTES, V. LEFEBVRE és A. PALLOIX (2000): A CAPS marker to assist selection of tomato spotted wilt virus (TSWV) resistance in pepper. *Genome*, 43 (1): 137–142.
153. MUELLER, U. és L. L. WOLFENBARGER (1999): AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution*, 14 (10): 389–394.
154. NAGY, J. (2007): *A Börzsöny hegység edényes flórája (Vascular flora of Börzsöny Mountains)*. Duna-Ipoly Nemzeti Park Igazgatóság, Budapest, 378 pp.
155. NIETO, C., F. PIRON, M. DALMAIS, C. F. MARCO, E. MORIONES, M. L. GÓMEZ-GUILLAMÓN, V. TRUNIGER, P. GÓMEZ, J. GARCIA-MAS, M. A. ARANDA és A. BENDAHDANE (2007): EcoTILLING for the identification of allelic variants of melon eIF4E, a factor that controls virus susceptibility. *BMC Plant Biology*, 7 (34): 1–9.
156. NYBOM, H. (2004): Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13 (5): 1143–1455.
157. NYBOM, H., G. D. ESSELINK, G. WERLEMARK és B. VOSMAN (2004): Microsatellite DNA marker inheritance indicates preferential pairing between two highly homologous genomes in polyploid and hemisexual dog-roses, *Rosa* L. sect. *Caninae* DC. *Heredity*, 92 (3): 139–150.
158. NYBOM, H., G. D. ESSELINK, G. WERLEMARK, L. LEUS és B. VOSMAN (2006): Unique genomic configuration revealed by microsatellite DNA in polyploid dogroses, *Rosa* sect. *Caninae*. *Journal of Evolutionary Biology*, 19 (2): 635–648.
159. O'HANLON, P. C., R. PEAKALL és D. T. BRIESE (1999): Amplified fragment length polymorphism (AFLP) reveals introgression in weedy *Onopordum thistles*: hybridization and invasion. *Molecular Ecology*, 8 (8): 1239–1246.
160. OLEYKOWSKI, C. A., C. R. BRONSON MULLINS, A. K. GODWIN és A. T. YEUNG (1998): Mutation detection using a novel plant endonuclease. *Nucleic Acids Research*, 26 (20): 4597–4602.
161. OLMO, H. P. (1976): Grapes. In: N. W. SIMMONDS (szerk.), *Evolution of crop plants*, Longman, London. pp. 294–298.
162. ORITA, M., H. IWAHANA, H. KANAZAWA, K. HAYASHI és T. SEKIYA (1989): Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *PNAS*, 86 (8): 2766–2770.
163. PEARSON, H. M. (1932): Parthenocarpy and seedlessness in *Vitis vinifera*. *Science*, 76 (1982): 594.
-

164. PENG, F. Y., K. E. REID, N. LIAO, J. SCHLOSSER, D. LIJAVETZKY, R. HOLT, J. M. MARTÍNEZ ZAPATER, S. JONES, M. MARRA, J. BOHLMANN és S. T. LUND (2007): Generation of ESTs in *Vitis vinifera* wine grape (Cabernet Sauvignon) and table grape (Muscat Hamburg) and discovery of new candidate genes with potential roles in berry development. *Gene*, 402 (1-2): 40–50.
165. PETTENKOFFER, S. (1930): *Szőlőművelés*. Pátria Irodalmi Vállalat és Nyomdai Részvénytársaság, Budapest, 431 pp.
166. PIMKIN, M., E. CARETTI, A. CANUTESCU, J. B. YEUNG, H. COHN, Y. CHEN, C. OLEYKOWSKI, A. BELLACOSA és A. T. YEUNG (2007): Recombinant nucleases CEL I from celery and SP I from spinach for mutation detection. *BMC Biotechnology*, 7 (29): 1–8.
167. PODANI, J. (1997): *Bevezetés a többváltozós biológiai adatfeltárás rejtelmeibe*. Scientia Kiadó, Budapest, 412 pp.
168. PODANI, J. (2007): *A szárazföldi növények evolúciója és rendszertana*. ELTE Eötvös Kiadó, Budapest, 2. kiadás, 300 pp.
169. POMMER, C. V., E. J. P. PIRES, M. M. TERRAE és I. R. S. PASSOS (1996): Streptomycin-induced seedlessness in the grape cultivar Rubi (Italia Red). *American Journal of Enology and Viticulture*, 47 (3): 340–342.
170. POPEK, R. (1996): Biosystematyczne studia nad rodzajem *Rosa* L. In: *Polsce i krajach ościennych*, Wydawnictwo Naukowe WSP, Kraków.
171. POPEK, R. (2007): *Dziko rosnące róże Europy*, Officina Botanica, Kraków.
172. POPEK, R., G. FACSAR és J. MALECZKA (1991): Cyto-taxonomische Untersuchungen an der Gattung *Rosa* (*Rosaceae*) – die Arten aus Ungarn und anderen Gebieten. *Fragm. Flor. Geobot.*, 36: 81–87.
173. POSADA, D. és K. CRANDALL (2001): Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends In Ecology and Evolution*, 16 (1): 37–45.
174. POSPISILOVA, D. és V. PALENIK (1988): Heredity of seedlessness in grapes. *Genetika Slechteni*, 24: 325–332.
175. QUELLER, D., J. STRASSMANN és C. HUGHES (1993): Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology & Evolution*, 8 (8): 285–288.
176. RAJAPAKSE, S., M. HUBBARD, J. KELLY, A. ABBOTT és R. BALLARD (1992): Identification of Rose cultivars by Restriction-Fragment-Length-Polymorphism. *Scientia Horticulturae*, 52 (3): 237–245.
177. RAJAPAKSE, S., D. H. BYRNE, L. ZHANG, N. ANDERSON, K. ARUMUGANATHAN és R. E. BALLARD (2001): Two genetic linkage maps of tetraploid roses. *Theoretical and Applied Genetics*, 103 (4): 575–583.
178. RAMMING, D. W., C. A. LEDBETTER és R. TARAIOLO (1990): Hybridization of seedless grapes. In: *Proceedings of the 5th International Symposium on Grape Breeding, 12-16 September 1989, St. Martin/Pfalz, FR of Germany*. pp. 439–444.

-
179. RAMMING, D. W., R. L. EMERSHAD és R. TARAİLO (2000): A stenospermocarpic, seedless *Vitis vinifera* × *Vitis rotundifolia* hybrid developed by embryo rescue. *HortScience*, 35 (4): 732–734.
180. REHDER, A. (1940): *Manual of cultivated trees and shrubs*. MacMillan, New York, USA.
181. REIF, J. C., A. E. MELCHINGER és M. FRISCH (2005): Genetical and mathematical properties of similarity and dissimilarity coefficients applied in plant breeding and seed bank management. *Crop Science*, 45 (1): 1–7.
182. REISCH, C., S. SCHURM és P. POSCHLOD (2007): Spatial genetic structure and clonal diversity in an alpine population of *Salix herbacea* (Salicaceae). *Annals of Botany*, 99 (4): 647–651.
183. ŘEPKOVÁ, J., A. DREISEITL és P. LÍZAL (2009): New CAPS marker for selection of a barley powdery mildew resistance gene in the *Mlo* locus. *Cereal Research Communications*, 37 (1): 93–99.
184. RICE, P., I. LONGDEN és A. BLEASBY (2000): EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics*, 16 (6): 276–277.
185. RITZ, C. M. (2005): *Evolution von Hundrosen (Rosa L. sect. Caninae (DC.) SER.)*. PhD értekezés, Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller- Universität Jena, Jena, 98 pp.
186. RITZ, C. M. és V. WISSEMAN (2003): Male-correlated non-matrocinal character inheritance in reciprocal hybrids of *Rosa* section *Caninae* (DC.) Ser. (Rosaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 241 (3–4): 213–221.
187. RITZ, C. M., H. SCHMUTHS és V. WISSEMAN (2005): Evolution by reticulation: European dogroses originated by multiple hybridization across the genus *Rosa*. *Journal of Heredity*, 96 (1): 4–14.
188. ROCHE, P., F. H. ALSTON, C. MALIEPAARD, K. M. EVANS, R. VRIELINK, F. DUNEMANN, T. MARKUSSEN, S. TARTARINI, L. M. BROWN, C. RYDER és G. J. KING (1997): RFLP and RAPD markers linked to the rosy leaf curling aphid resistance gene (Sd1) in apple. *Theoretical and Applied Genetics*, 94 (3–4): 528–533.
189. RÖSCH, P., W. KIEFER és J. POPP (2002): Chemotaxonomy of mints of genus *Mentha* by applying Raman spectroscopy. *Biopolymers*, 67 (4–5): 358–361.
190. ROUNSLEY, S. D., G. S. DITTA és M. F. YANOFSKY (1995): Diverse roles for MADS box genes in *Arabidopsis* development. *Plant Cell*, 7 (8): 1259–1269.
191. ROWLEY, G. (1960): Aneuploidy in the genus *Rosa*. *Journal of Genetics*, 57 (2–3): 253–268.
192. ROYTCHEV, V. (1998): Inheritance of grape seedlessness in seeded and seedless hybrid combinations of grape cultivars with complex genealogy. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49 (3): 302–305.
-

193. RUSANOV, K., N. KOVACHEVA, B. VOSMAN, L. ZHANG, S. RAJAPAKSE, A. ATANASSOV és I. ATANASSOV (2005): Microsatellite analysis of *Rosa damascena* MILL. accessions reveals genetic similarity between genotypes used for rose oil production and old Damask rose varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 111 (4): 804–809.
194. SAITOU, N. és M. NEI (1987): The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4 (4): 406–425.
195. SAMBROOK, J. és D. RUSSEL (2001): *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 3rd kiadás, 2344 pp.
196. SAMBROOK, J., E. F. FTRITSCH és T. MANIATIS (1982): *Molecular cloning – a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, second kiadás.
197. SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, R., T. G. DAVIES, J. O. COLEMAN és P. A. REA (2001): The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (32): 30231–30244.
198. SANDHU, A. S., J. S. JAWANDA és D. K. UPPAL (1984): Inheritance of seed characters in hybrid populations in intercultural crosses of grapes (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Research Punjab Agricultural University*, 21: 39–44.
199. SARMIENTO, C., L. NIGUL, J. KAZANTSEVA, M. BUSCHMANN és E. TRUVE (2006): AtRLI2 is an endogenous suppressor of RNA silencing. *Plant Molecular Biology*, 61 (1-2): 153–163.
200. SATO, A., H. YAMANE, M. YAMADA és K. YOSHINAGA (1994): Inheritance of seedlessness in grapes. *Journal of the Japan Society of Horticultural Science*, 63: 1–7.
201. SEFC, K. M., H. STEINKELLNER, J. GÖSSL, S. KAMPFER és F. REGNER (1998): Reconstruction of a grapevine pedigree by microsatellite analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 97 (1–2): 227–231.
202. SEREGÉLY, ZS., T. DEÁK és GY. D. BISZTRAY (2004): Distinguishing melon genotypes using NIR spectroscopy. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 72 (2): 195–203.
203. SOUTHERN, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98 (3): 503–517.
204. SPIEGEL-ROY, P., Y. BARON és N. SAHAR (1990): Inheritance of seedlessness in seeded × seedless progeny of *Vitis vinifera* L. *Vitis*, 29: 79–83.
205. STAUB, J. E., F. C. SERQUEN és M. GUPTA (1996): Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *HortScience*, 31 (5): 729–741.
206. STOUT, A. B. (1936): Seedlessness in grapes. Technical Report 238, New York State Agricultural Experiment Station, Geneva.
207. STOUT, A. B. (1939): Progress in Breeding for Seedless Grapes. *Proceedings of the American Society for Horticultural Sciences*, 37 (8): 627–629.

-
208. STRIEM, M., G. BEN-HAYYIM és P. SPIEGEL-ROY (1996): Identification of molecular genetic markers associated with seedlessness in grapes: Demonstration of Marker Assisted Selection (MAS). *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 121 (5): 758–763.
209. STRIEM, M. J., P. SPIEGEL-ROY, I. BARON és N. SAHAR (1992): The degrees of development of the seed-coat and the endosperm as separate subtraits of stenospermocarpic seedlessness in grapes. *Vitis*, 31: 149–155.
210. SUNNUCKS, P., A. C. C. WILSON, L. B. BEHEREGARAY, K. ZENGER, J. FRENCH és A. C. TAYLOR (2000): SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Molecular Ecology*, 9 (11): 1699–1710.
211. SZ. NAGY, L. (2002): Some important results in vine breeding at the Faculty of Viticulture of the Horticultural Department of the Szent István University. *International Journal of horticultural Science*, 8 (1): 37–40.
212. TÄCKHOLM, G. (1920): On the cytology of the genus *Rosa*. *Svensk Botanisk Tidskrift*, 14 (2–3): 300–311.
213. TÄCKHOLM, G. (1922): Zytologische Studien über die Gattung *Rosa*. *Acta Horti Bergiani*, 7 (3): 97–381.
214. TAPIA-LÓPEZ, R., B. GARCÍA-PONCE, J. G. DUBROVSKY, A. GARAY-ARROYO, R. V. PÉREZ-RUÍZ, S.-H. KIM, F. ACEVEDO, S. PELAZ és E. R. ALVAREZ-BUYLLA (2008): An AGAMOUS-related MADS-box gene, XAL1 (AGL12), regulates root meristem cell proliferation and flowering transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 146 (3): 1182–1192.
215. TEAM, R. D. C. (2009): *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0.
216. THIS, P., T. LACOMBE és M. R. THOMAS (2006): Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends in Genetics*, 22 (9): 511–519.
217. TIAN, L., Y. WANG, L. NIU és D. TANG (2008): Breeding of disease-resistant seedless grapes using Chinese wild *Vitis* spp. I. – *In vitro* embryo rescue and plant development. *Scientia Horticulturae*, 117 (2): 136–141.
218. TILL, B. J., T. ZERR, L. COMAI és S. HENIKOFF (2006): A protocol for TILLING and Ecotilling in plants and animals. *Nature Protocols*, 1 (5): 2465–2477.
219. TIPPERY, N. P. és D. H. LES (2008): Phylogenetic analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region in *Menyanthaceae* using predicted secondary structure. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49 (2): 526–537.
220. TORRES, A. M., T. MILLAN és J. I. CUBERO (1993): Identifying rose cultivars using Random Amplified Polymorphic DNA markers. *HortScience*, 28 (4): 333–334.
-

221. TRIANA, J., J. L. EIROA, J. J. ORTEGA, F. LEÓN, I. BROUARD, J. C. HERNÁNDEZ, F. ESTÉVEZ és J. BERMEJO (2010): Chemotaxonomy of *Gonospermum* and related genera. *Phytochemistry*, in press.
222. TRINDADE, H., M. M. COSTA, S. B. LIMA, L. G. PEDRO, A. C. FIGUEIREDO és J. G. BARROSO (2009): A combined approach using RAPD, ISSR and volatile analysis for the characterization of *Thymus caespititius* from Flores, Corvo and Graciosa islands (Azores, Portugal). *Biochemical Systematics and Ecology*, 37 (5): 670–677.
223. TROGGIO, M., S. VEZZULLI, M. PINDO, G. MALACARNE, P. FONTANA, F. MOREIRA, L. COSTANTINI, M. GRANDO, R. VIOLA és R. VELASCO (2008): Beyond the genome, opportunities for a modern viticulture: A research overview. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59 (2): 117–127.
224. TSOLOVA, V. és A. ATANASSOV (1994): Induction of polyembryony and secondary embryogenesis in culture for embryo rescue of stenospermocarpic genotypes of *Vitis vinifera* L. *Vitis*, 33 (1): 55–56.
225. VÁRALLYAY, E., J. BURGYÁN és Z. HAVELDA (2007): Detection of microRNAs by Northern blot analyses using LNA probes. *Methods*, 43 (2): 140–145.
226. VARGAS, A. M., M. T. DE ANDRÉS, J. BORREGO és J. IBÁÑEZ (2009): Pedigrees of fifty table-grape cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60 (4): 525–532.
227. VELASCO, R., A. ZHARKIKH, M. TROGGIO, D. A. CARTWRIGHT, A. CESTARO, D. PRUSS, M. PINDO, L. M. FITZGERALD, S. VEZZULLI, J. REID, G. MALACARNE, D. ILIEV, G. COPPOLA, B. WARDELL, D. MICHELETTI, T. MACALMA, M. FACCI, J. T. MITCHELL, M. PERAZZOLLI, G. ELDREDGE, P. GATTO, R. OYZERSKI, M. MORETTO, N. GUTIN, M. STEFANINI, Y. CHEN, C. SEGALA, C. DAVENPORT, L. DEMATTÈ, A. MRAZ, J. BATTILANA, K. STORMO, F. COSTA, Q. TAO, A. SI-AMMOUR, T. HARKINS, A. LACKEY, C. PERBOST, B. TAILLON, A. STELLA, V. SOLOVYEV, J. A. FAWCETT, L. STERCK, K. VANDEPOELE, S. M. GRANDO, S. TOPPO, C. MOSER, J. LANCHBURY, R. BOGDEN, M. SKOLNICK, V. SGARAMELLA, S. K. BHATNAGAR, P. FONTANA, A. GUTIN, Y. VAN DE PEER, F. SALAMINI és R. VIOLA (2007): A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS ONE*, 2 (12): e1326.
228. VENABLES, W. N. és B. D. RIPLEY (2002): *Modern Applied Statistics with S*. Springer, New York, fourth kiadás. ISBN 0-387-95457-0.
229. VERRIER, P. J., D. BIRD, B. BURLA, E. DASSA, C. FORESTIER, M. GEISLER, M. KLEIN, U. KOLUKISAAGLU, Y. LEE, E. MARTINOIA, A. MURPHY, P. A. REA, L. SAMUELS, B. SCHULZ, E. J. SPALDING, K. YAZAKI és F. L. THEODOULOU (2008): Plant ABC proteins – a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in Plant Science*, 13 (4): 151–159.
230. VOS, P., R. HOGERS, M. BLEEKER, M. REIJANS, T. VANDELEE, M. HORNES, A. FRIJTERS, J. POT, J. PELEMAN, M. KUIPER és M. ZABEAU (1995): AFLP – A new technique for DNA-fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23 (21): 4407–4414.

-
231. VOSMAN, B., D. VISSER, J. R. VAN DER VOORT, M. J. M. SMULDERS és F. VAN EEUWIJK (2004): The establishment of 'essential derivation' among rose varieties using AFLP. *Theoretical and Applied Genetics*, 109 (8): 1718–1725.
232. WANG, H., M. J. MOORE, P. S. SOLTIS, C. D. BELL, S. F. BROCKINGTON, R. ALEXANDRE, C. C. DAVIS, M. LATVIS, S. R. MANCHESTER és D. E. SOLTIS (2009): Rosid radiation and the rapid rise of angiosperm-dominated forests. *PNAS*, 106 (10): 3853–3858.
233. WEBER, J. L. és P. E. MAY (1989): Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44 (3): 388–396.
234. WEILAND, J. J. és M. H. YU (2003): A Cleaved Amplified Polymorphic Sequence (CAPS) marker associated with root-knot nematode resistance in sugarbeet. *Crop Science*, 43 (5): 1814–1818.
235. WEINBERGER, J. H. és F. N. HARMON (1964): Seedlessness in vinifera grapes. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science*, 85: 270–274.
236. WELSH, J. és M. MCCLELLAND (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18 (24): 7213–7218.
237. WERLEMARK, G. (2000): Evidence of apomixis in hemisexual dogroses, *Rosa* section *Caninae*. *Sexual Plant Reproduction*, 12 (6): 353–359.
238. WERLEMARK, G. és H. NYBOM (2001): Skewed distribution of morphological character scores and molecular markers in three interspecific crosses in *Rosa* section *Caninae*. *Hereditas*, 134 (1): 1–13.
239. WERLEMARK, G., M. UGGLA és H. NYBOM (1999): Morphological and RAPD markers show a highly skewed distribution in a pair of reciprocal crosses between hemisexual dogrose species, *Rosa* sect. *Caninae*. *Theoretical and Applied Genetics*, 98 (3–4): 557–563.
240. WILLIAMS, J. G. K., K. J. KUBELIK, J. A. LIVAK, RAFALSKI és S. V. TINGEY (1990): DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6526–6535.
241. WISSEMAN, V. (2000a): Epicuticular wax morphology and the taxonomy of *Rosa* (section *Caninae*, subsection *Rubiginosae*). *Plant Systematics And Evolution*, 221 (1–2): 107–112.
242. WISSEMAN, V. (2000b): Molekulargenetische und morphologisch-anatomische Untersuchungen zur Evolution und Genomzusammensetzung von Wildrosen der Sektion *Caninae* (DC.) SER. *Botanischer Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*, 122: 357–429.
243. WISSEMAN, V. (2002): Molecular evidence for allopolyploid origin of the *Rosa canina* complex (*Rosaceae*, *Rosoideae*). *Journal of Applied Botany*, 76 (5–6): 176–178.
-

244. WISSEMAN, V. (2003): Conventional taxonomy of wild roses. In: A. ROBERTS, T. DEBENER és S. GUDIN (szerk.), *Encyclopedia of Rose Science*, Elsevier, London, UK. pp. 111–117.
245. WISSEMAN, V. és C. M. RITZ (2005): The genus *Rosa* (*Rosoideae*, *Rosaceae*) revisited: molecular analysis of nrITS-1 and atpB-rbcL intergenic spacer (IGS) versus conventional taxonomy. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 147 (3): 275–290.
246. WISSEMAN, V. és C. M. RITZ (2007): Evolutionary patterns and processes in the genus *Rosa* (*Rosaceae*) and their implications for host-parasite co-evolution. *Plant Systematics And Evolution*, 266 (1–2): 79–89.
247. WISSEMAN, V., M. RIEDEL és M. RIEDERER (2007): Matroclinal inheritance of cuticular waxes in reciprocal hybrids of *Rosa* species, sect. *Caninae* (*Rosaceae*). *Plant Systematics And Evolution*, 263 (3–4): 181–190.
248. WU, S., S. NISHIHARA és Y. UEDA (2001a): Phylogenetic analysis of section *Synstylae* in the genus *Rosa* based on RAPD markers. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 547: 391–402.
249. WU, S., Y. UEDA, S. NISHIHARA és S. MATSUMOTO (2001b): Phylogenetic analysis of Japanese *Rosa* species using DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacers (ITS). *Journal Of Horticultural Science & Biotechnology*, 76 (2): 127–132.
250. WU, S.-B., G. COLLINS és M. SEDGLEY (2004): A molecular linkage map of olive (*Olea europaea* L.) based on RAPD, microsatellite, and SCAR markers. *Genome*, 47 (1): 26–35.
251. WU, S. Q., Y. UEDA, H. HE, S. NISHIHARA és S. MATSUMOTO (2000): Phylogenetic analysis of Japanese *Rosa* species using *matK* sequences. *Breeding Science*, 50: 275–281.
252. XU, Q., X. WEN és X. DENG (2004): A simple protocol for isolating genomic DNA from chestnut rose (*Rosa roxburgii* Tratt) for RFLP and PCR analyses. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22 (3): 301a–301g.
253. XU, Z., Y. XIE, D. HONG, P. LIU és G. YANG (2009): Fine mapping of the epistatic suppressor gene (*esp*) of a recessive genic male sterility in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Genome*, 52 (9): 755–760.
254. YAN, Z., C. DENNEBOOM, A. HATTENDORF, O. DOLSTRA, T. DEBENER, P. STAM és P. B. VISSER (2005): Construction of an integrated map of rose with AFLP, SSR, PK, RGA, RFLP, SCAR and morphological markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 110 (4): 766–777.
255. YANG, K. Q., Y. J. WANG, J. J. ZHANG, X. P. WANG, Y. Z. WAN és J. X. ZHANG (2006): Analysis of restriction sites and Southern blotting of two molecular markers linked to grape seedless gene. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*, 3 (1): 13–17.
256. YEAM, I., B.-C. KANG, W. LINDEMAN, J. D. FRANTZ, N. FABER és M. M. JAHN (2005): Allele-specific CAPS markers based on point mutations in resistance alleles at the *pvr1* locus encoding eIF4E in *Capsicum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 112 (1): 178–186.

-
257. YOKOYA, K., A. V. ROBERTS, J. MOTTLEY, R. LEWIS és P. E. BRANDHAM (2000): Nuclear DNA amounts in roses. *Annals of Botany*, 85 (4): 557–561.
258. YU, M. H., L. M. PAKISH és H. ZHOU (2001): An isozyme marker for resistance to root-knot nematode in sugarbeet. *Crop Science*, 41 (4): 1051–1053.
259. ZHANG, L., D. BYRNE, R. BALLARD és S. RAJAPAKSE (2006): Microsatellite marker development in rose and its application in tetraploid mapping. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131 (3): 380–387.
260. ZHOU, M. P., M. J. HAYDEN, Z. Y. ZHANG, W. Z. LU és H. X. MA (2010): Saturation and mapping of a major *Fusarium* head blight resistance QTL on chromosome 3BS of Sumai 3 wheat. *Journal of Applied Genetics*, 51 (1): 19–25.
261. ZIELIŃSKY (1985): Studia nad rodzajem *Rosa* L. Systematyka sekcji *Caninae* DC. em. CHRIST. *Arboretum Kórnickie, Rocznik*, 30: 1–109.
262. ZIELIŃSKY (1987): *Rodzaj Rosa* L., kötet 5. Polska Akademia Nauk, Kraków, 1–48 pp.

9. Mellékletek

M1. A *Rosa* genus rendszertani felosztása (REHDER, 1940) és (WISSEMAN, 2003) alapján. (Kivonat)

REHDER (1940) rendszere az alábbiakban csupán kivonatossan, elsősorban a dolgozat szempontjából fontos taxonokra koncentrálva kerül bemutatásra. A mellékletnek nem célja átfogóan ismertetni a rózsza nemzetség rendszertanát, ezért a számos interspecifikus hibrid bemutatásától – amelyek REHDER (1940) rendszerében szintén megtalálhatóak – szintén eltekintek.

I. subgenus: *Hulthemia* (DUMORT.) FOCKE. 1888

Monotipikus alnemzetség, egyetlen képviselője a *R. persica* MICHX. ex JUSS. 1789 ($2n = 2x = 14$).

II. subgenus: *Eurosa* (REHDER, 1940) vagy *Rosa* (WISSEMAN, 2003)

1. sectio: *Pimpinellifoliae* (DC.) SER. 1825. Mintegy 15 ázsiai és európai faj tartozik ebbe a szekcióba. További rendszertani felosztása vitatott. Legfontosabb képviselői: *R. foetida* J. HERRM. 1762 ($2n = 4x = 28$), *R. myriacantha* DC. 1805 ($2n = 4x = 28$), *R. spinosissima* L. 1753 ($2n = 4x = 28$).

2. sectio: *Rosa* (=sect. *Gallicanae* (DC.) SER.) 1825. A *R. gallica* L. 1759 ($2n = 4x = 28$) mellett ehhez a szekcióhoz sorolnak számos faji szintre emelt hibridet, amelyek régóta termesztésben vannak és természetes előfordulásuk kérdéses (ezek nagy része tetraploid: $2n = 4x = 28$, de találhatók közöttük pentaploid: $2n = 5x = 35$ egyedek is.): pl. *R. alba* L. 1753, *R. centifolia* L. 1753, *R. francofurtana* MÜNCHHAUSEN 1774.

3. sectio: *Caninae* (DC.) SER. 1825. A szekció tagjaira jellemző a kiegyenlítettlen meiózis, mely ivaros úton tartja fent a páratlan kromoszóma(szerelvény)-számot.

Subsect. Trachyphyllae H. CHRIST. 1873. Legfontosabb képviselője: *R. jundzillii* BESSER 1815 ($2n = 6x = 42$). Hibrid eredetű, anyai szülőpartner a *Caninae* szekció egy tagja, apai eredetű szülőpartnere a *R. gallica* L..

Subsect. Rubrifoliae CRÉP. 1892. A *R. glauca* POURR. 1788 ($2n = 4x = 28$) morfológiai bélyegei alapján a *Cinnamomeae* szekcióba tartozna, ám kiegyenlítetlen meiózisa miatt a *Caninae* szekcióba sorolják.

Subsect. Vestitae H. CHRIST. 1873. Legfontosabb képviselői: *R. mollis* SM. 1812 ($2n = 4x, 5x, 6x = 28, 35, 42$), *R. pseudoscabriuscula* (R. KELLER) HENKER & G. SCHULZE 1993 ($2n = 5x = 35$), *R. sherardii* DAVIES 1813 ($2n = 4x, 5x, 6x = 28, 35, 42$), *R. tomentosa* SM. 1800 ($2n = 5x = 35$), *R. villosa* L. 1753 ($2n = 4x, 8x = 26, 56$).

Subsect. Rubigineae H. CHRIST 1873. Legfontosabb képviselői: *R. agrestis* SAVI 1798 ($2n = 5x, 6x = 35, 42$), *R. inodora* FR. 1812 ($2n = 5x, 6x = 35, 42$), *R. micrantha* BORRER ex SM. 1812 ($2n = 4x, 5x, 6x = 28, 35, 42$), *R. rubiginosa* L. 1771 ($2n = 5x = 35$).

Subsect. Tomentellae H. CHRIST 1873. Legfontosabb képviselője: *R. tomentella* LÉMAN in CASSINI 1818 ($2n = 5x = 35$).

Subsect. Caninae. A szekció legnépesebb alszekciója. Legfontosabb képviselői: *R. caesia* SM. 1812 ($2n = 5x, 6x = 35, 42$), *R. canina* L. 1753 ($2n = 5x = 35$), *R. corymbifera* BORKH. ($2n = 5x = 35$), *R. dumalis* BECHST 1819 ($2n = 5x, 6x = 35, 42$), *R. montana* CHAIX in VILLARS 1786 ($2n = 5x = 35$), *R. stylosa* DESVAUX 1809 ($2n = 5x, 6x = 35, 42$), *R. subcanina* (H. CHRIST) R. KELLER 1891 ($2n = 5x = 35$), *R. subcollina* (H. CHRIST) R. KELLER 1891 ($2n = 5x = 35$).

4. sectio: Carolinae CRÉP. 1891. Mintegy 5 észak-amerikai fajt magába foglaló szekció, legfontosabb képviselői: *R. carolina* L. 1753 ($2n = 4x = 28$), *R. virginiana* HERRM. 1762 ($2n = 4x = 28$).

5. sectio: Cinnamomeae (DC.) SER. 1825. Az alábbiakban a szekcióba tartozó számos ázsiai, észak-amerikai és európai faj közül csupán pár európai jelentőségű kerül felsorolásra: *R. blanda* AIT. 1789 ($2n = 2x = 14$), *R. davidii* CRÉP. 1874 ($2n = 4x = 28$), *R. laxa* RETZ 1803 ($2n = 2x = 14$), *R. majalis* HERRM. 1762 ($2n = 2x = 14$), *R. pendulina* L. 1753 ($2n = 4x = 28$), *R. rugosa* THUMB. 1784 ($2n = 2x = 14$).

6. sectio: Synstylae DC. 1813. A fentiekhez hasonlóan az alábbiakban a szekcióba tartozó ázsiai, észak-amerikai és afrikai faj közül csupán pár európai jelentőségű kerül felsorolásra: *R. arvensis* HUDS. 1762 ($2n = 2x = 14$), *R. moschata* HERRM. 1762 ($2n = 2x = 14$), *R. multiflora* THUMB. ex MURR. 1784 ($2n = 2x, 3x = 24, 21$), *R. sempervirens* L. 1735 ($2n = 2x = 14$).

7. sectio: Indicae THORY 1820. A szekcióba három ázsiai faj tartozik: *R. odorata* (ANDREWS) SWEET 1818, *R. gigantea* COLLET ex CRÉP. 1888 és *R. chinensis* Jacq. 1768 ($2n = 2x, 3x, 4x = 14, 21, 28$).

8. sectio: *Banksianae* LINDL. 1820. Két kínai faj tartozik ebbe a szekcióba: *R. banksiae* AIT. 1811 ($2n = 2x, 4x = 13, 28$). A *R. cymosa* TRATT. 1823 besorolása a *Banksianae* szekcióba bizonytalan.

9. sectio: *Laevigatae* THORY 1820. A szekciót egyetlen kínai faj: a *R. laevigata* MICHX. 1803 ($2n = 2x = 14$) képezi.

10. sectio: *Bracteatae* THORY 1820.: Egy ill. két ázsiai faj: *R. bracteata* WENDL 1798. A *R. clinophylla* THORY ide sorolása bizonytalan.

III. subgenus: *Platyrhodon* (HURST) REHDER 1940

Egy japán ill. kínai faj alkotja: *R. roxburghii* TRATT. 1823.

IV. subgenus: *Hesperhodos* COCKERELL 1913

Két észak-amerikai faj: *R. stellata* WOOTON 1898 ($2n = 2x = 14$) és *R. minutifolia* ENGELMANN 1882 ($2n = 2x = 14$) alkotja.

M2. Kiegészítő információk az Anyag és módszer fejezethez

M2.1. A vizsgált rózsák egyedek

11. táblázat: Kiegészítő információk a vizsgálatokba vont rózsák egyedeiről. A sorszám mintagyűjtési sorszám, a génbanki azonosítók a Budapesti Corvinus Egyetem Soroksári Botanikus Kertjének azonosítói. A taxonok rendszertani besorolása, ploidszintje a 3. táblázatban található. A hibriditásra, származási helyre vonatkozó információk és a megjegyzések FACSAR GÉZA szóbeli közlése alapján kerültek feltüntetésre.

Sorszám	Génbanki azonosító	Taxon	Hibriditás ^a	Gyűjtési hely	Megjegyzés
2 ^{b,c}	220	<i>R. arvensis</i>		Tenkes	
4 ^c	107	<i>R. pimpinellifolia</i> var. <i>spinosissima</i>		Csillebérc	
5 ^c	106	<i>R. pimpinellifolia</i> var. <i>pimpinellifolia</i>		Kamaraerdő, Tétnyi plató	
6 ^{b,c}	157	<i>R. pimpinellifolia</i> var. <i>pimpinellifolia</i>	× !	Bükk, Bélkő	2 virágú, óriás termetű
7 ^{b,c}	155	<i>R. pimpinellifolia</i> var. <i>spinosissima</i>		Hajósi pincék	alacsony, kékesszürke levelű
9 ^{b,c}	145	<i>R. myriacantha</i>		Bulgária, Vihren	
11 ^c	151	<i>R. × reversa</i>	×	Börzsöny, Sasfészek	nm. <i>holikensis</i>
12 ^c	151/a	<i>R. × reversa</i>	×	Bulgária	subsp. <i>spinosissima</i> DIMITROV
21 ^b	87	<i>R. blanda</i>		Budapest, Martinovics hegy	
22 ^b	117	<i>R. × francofurtana</i>	c × !	Füle, Kő-hegy	kultúrhibrid
23 ^b	n. a.	<i>R. × francofurtana</i>	c × !	Budapest, Kelenföldi pu.	kultúrhibrid
26 ^b	22/304	<i>R. gallica</i>	c ×	Vértes, Gánt, Meleges	termesztett, cv. 'Officinalis'
28 ^c	61	<i>R. gallica</i>	c ×	Mátrafüred	var. <i>austriaca</i>

Folytatás a következő oldalon

Folytatás az előző oldalról

Sorszám	Génbanki azonosító	Taxon	Hibriditás ^a	Gyűjtési hely	Megjegyzés
31 ^c	115	<i>R. gallica</i>	c ×	Budakeszi, Kavics-árok	var. <i>virescens</i>
42 ^b	186	<i>R. gallica</i>	c × !	Macedónia, Dojran	pentaploid, (2n = 5x = 35) hibrid
50 ^b	41	<i>R. jundzillii</i>	×	Bükk, Szarvaskő	sötét virágú
54 ^b	252	<i>R. jundzillii</i>	×	Diósjenő, Závoz	var. <i>eminens</i> ; kérdés, valóban <i>jund-</i> <i>zillii</i> -e
63 ^b	125	<i>R. × speciosa</i>	×	Budapest, Hármashatárhegy, Felső- Kecskéhegy	<i>R. jundzillii</i> × <i>R. gallica</i> ?
65 ^b	n. a.	<i>R. × damascena</i>	c ×	Bulgária	'Trigintipetala'
68 ^b	V/1	<i>R. sherardii</i>		Doboz	
73 ^b	VII/4	<i>R. pseudoscabriuscula</i>		Kőszegi hegység, Kalaposkő	
75 ^b	283	<i>R. × spinulifolia</i> nm. <i>hawrana</i>	×	Börzsöny, Nagy-Mána	<i>R. scabriuscula</i> × <i>R. pendulina</i> ?
77 ^b	291	<i>R. villosa</i>		Csehország, Železná hory	subsp. <i>pomifera</i> , nagy termetű
80 ^b	80	<i>R. heckeliana</i>		Görögország, Olümposz	
81 ^b	81	<i>R. caryophyllacaea</i>	×	Szlovákia, Silická planina	<i>R. zalana</i> × ?
83 ^b	262	<i>R. zalana</i>		Börzsöny, Diósjenő, Kőszirt	
87 ^b	I/4	<i>R. szabói</i>		Somlóvásárhely, Somló hegy	
88 ^b	202	<i>R. rubiginosa</i>		Csopak	alany, egyenlő tüskézetű
89 ^b	201	<i>R. rubiginosa</i>		Bakony, Miklóspál-hegy	kevert, sűrű tüskézet
90 ^b	131	<i>R. horrida</i>		Bulgária, Červenata Stena	
98 ^b	204	<i>R. micrantha</i>	×	Kismaros, Istató	„heteracantha”, 2n = 6x = 42
99 ^b	132	<i>R. micrantha</i>		Gerecse, Bersek-hegy	
101 ^b	134	<i>R. micrantha</i>		Olaszország, Palermo	<i>R. agrestis</i> -hez hasonló levélzet
102 ^b	130	<i>R. agrestis</i> var. <i>pontica</i>		Bulgária, Karlovo	

Folytatás a következő oldalon

Folytatás az előző oldalról

Sorszám	Génbanki azonosító	Taxon	Hibriditás ^a	Gyűjtési hely	Megjegyzés
106 ^b	221	<i>R. agrestis</i> var. <i>albiflora</i>		Tenkes	szőrös levelű
107 ^b	277	<i>R. agrestis</i> var. <i>vinodora</i>		Börzsöny, Diósjenő, Kőszirt	szőrös levelű
108 ^b	227a	<i>R. × vetvičkæ</i>	× !	Szlovákia, Zólyomi botanikus kert	<i>R. tomentosa</i> × <i>R. dumalis</i> ?, levél- szín is mirigyes
110 ^b	273	<i>R. gizellæ</i> var. <i>neogradensis</i>		Szlovákia, Rakat'a	
111 ^b	222	<i>R. inodora</i>	×	Bugyi	(<i>R. agrestis</i> var. <i>inodora</i>)
115 ^b	228	<i>R. inodora</i>		Öregcsertő	(<i>R. elliptica</i>)
117 ^b	VI/2	<i>R. caesia</i>		Németország, Harzlebener Berge	
119 ^b	231	<i>R. × kmetiana</i>	× !	Börzsöny, Kismaros	
123 ^b	103	<i>R. corymbifera</i>		Börzsöny, Magas-Tax	
124 ^b	n. a.	<i>R. dumalis</i>		Németország, Kaffberg	
125 ^b	n. a.	<i>R. inodora</i>	× !	Keszthelyi hegység	szőrös levelű
127 ^b	256	<i>R. canina</i> var. <i>blondeana</i>	×	Villány, Szársomlyó	kékesszürke, mirigyes levelű

^a Az egyed hibriditása

c – kultúrában létrejött és fenntartott

× – evolúciós hibrid

! – recens hibrid

^b Az AFLP vizsgálatokba vont egyedek^c A *CeII* alapú ITS vizsgálatokba vont egyedek

M2.2. Általános oldatok, pufferek

0,5 M EDTA (etilén-diamin-tetraecetsav), pH 8,0: 186, 1 g Na₂EDTA (Reanal, Magyarország) ~800 ml vízben feloldva, 20 g NaOH-ot adtam az oldathoz (pH 8,0 alatt az EDTA nem oldódik), majd a pH-t NaOH-dal állítottam be. (SAMBROOK és mts., 1982)

1 M Tris: 1 mol (121,1 g) bázikus trisz-(hidroximetil)-amino-metánt (Reanal, Magyarország) feloldottam 800 ml desztillált vízben, hozzáadtam a megfelelő mennyiségű koncentrált sósavat (60 ml pH 7,6-hoz, 42 ml pH 8,0-hoz), majd a pH beállítása után kiegészítettem 1 l-re. (SAMBROOK és mts., 1982)

10× TBE (tris-borát-EDTA): 90 mM bázikus trisz (tris-(hidroximetil)-amino-metán, Reanal, Magyarország), 90 mM bórsav (Reanal, Magyarország), 2 mM EDTA, vízben. (SAMBROOK és mts., 1982)

1× TE (tris-EDTA): 10 mM Tris (pH 7,6), 1 mM EDTA. (SAMBROOK és mts., 1982)

10× OPA (OnePhorAll): 100 mM Tris-HCl (pH7,5), 100 mM magnézium-acetát, 500 mM kálium-acetát. (Amersham Pharmacia, USA)

5 M KoAC (kálium-acetát): 29,442 g kálium acetát 50 ml desztillált vízben feloldva, a kémhatást jégecettel (Reanal, Magyarország) állítottam be pH 4,8-ra, majd 100 re desztillált vízzel feloldottam.

3 M NaoAC (nátrium-acetát): 24,6 g nátrium-acetátot (Reanal, Magyarország) feloldottam 80 ml desztillált vízben, a kémhatást jégecettel állítottam be pH 5,2-re, majd kiegészítettem 100 ml-re. (SAMBROOK és mts., 1982)

LB táptalaj: 1 w/v % tripton (Reanal, Magyarország), 0,5 w/v % élesztő-kivonat (Biolab, Magyarország), 1 w/v % NaCl. (SAMBROOK és mts., 1982)

FDE: 10 ml deionizált formamid (Sigma Aldrich, USA), 10 mg xilén-cianol (Sigma Aldrich, USA), 10 mg brómfenolkék (Sigma Aldrich, USA), 200 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0). (VÁRALLYAY és mts., 2007)

M2.3. AFLP protokoll

Adapter szekvenciák

Oligonukleotid	Szekvencia
<i>TruI</i> „felső”	5' -CTCGTAGACTGCGTACC-3'
<i>TruI</i> „alsó”	3' -CATCTGACGCATGGAT-5'
<i>EcoRI</i> „felső”	5' -GACGATGAGTCCTGAC-3'
<i>EcoRI</i> „alsó”	3' -CTACTCAGGACTGTTAA-5'

AFLP Primerek

Oligonukleotid	Szekvencia
<i>TruI</i> + 0	5' -GTAGACTGCGTACCTAAT-3'
<i>EcoRI</i> + 0	5' -GATGAGTCCTGACAATTC-3'
<i>TruI</i> + CAG	5' -GTAGACTGCGTACCTAATCAG-3'
<i>TruI</i> + CTT	5' -GTAGACTGCGTACCTAATCTT-3'
<i>EcoRI</i> + ACC	5' (FAM) GATGAGTCCTGACAATTCACC-3'
<i>EcoRI</i> + ATG	5' (JOE) GATGAGTCCTGACAATTCACC-3'

TruI restrikciós emésztés

Komponens	Törzsoldat	Mennyiség	Végkoncentráció
DNS	5 ng/μl	10 μl	50 ng
OPA	10×	4 μl	1×
<i>TruI</i>	10 U/μl	2 μl	20 U

40 μl végtérfogat MQ vízzel; 2 óra 65 °C

EcoRI restrikciós emésztés

Komponens	Törzsoldat	Mennyiség	Végkoncentráció
<i>TruI</i> emésztett DNS		20 μl	
OPA	10×	1 μl	1×
<i>EcoRI</i>	10 U/μl	0,5 μl	5 U

40 μl végtérfogat MQ vízzel; 2 óra 37 °C

Ligálás

Komponens	Törzsoldat	Mennyiség	Végkoncentráció
Emésztett DNS		20 μ l	
OPA	10 \times	2 μ l	1 \times
<i>Eco</i> RI adapter	5 μ M	1 μ l	125 nM
<i>Tru</i> I adapter	50 μ M	1 μ l	1,25 μ M
T4 DNS ligáz	5 U/ μ l	0,2 μ l	1 U
ATP	20 mM	0,2 μ l	100 μ M

40 μ l végtérfogat MQ vízzel; 2 óra 37 °C

+160 μ l MQ víz

Preszelektív amplifikáció

Komponens	Törzsoldat	Mennyiség	Végkoncentráció
Ligátum (hígított)		4 μ l	
PCR puffer	10 \times	2 μ l	1 \times
MgCl ₂	25 mM	1,2 μ l	1,5 mM
dNTP	10 mM	0,4 μ l	0,2 mM
<i>Eco</i> RI+0	10 μ M	0,5 μ l	0,25 μ M
<i>Tru</i> I+0	10 μ M	0,5 μ l	0,25 μ M
<i>Taq</i> polimeráz	5 U/ μ l	0,2 μ l	1 U

20 μ l végtérfogat MQ vízzel

Preszelektív PCR

94°C	2 min	20 \times
94°C	30 sec	
56°C	30 sec	
72°C	2 min	
72°C	2 min	
4°C	∞	
+80 μ l MQ víz		

Szelektív amplifikáció

Komponens	Törzsoldat	Mennyiség	Végkoncentráció
Preszelektív PCR termék (hígított)		1 μ l	
PCR puffer	10 \times	2 μ l	1 \times
MgCl ₂	25 mM	1,2 μ l	1,5 mM
dNTP	10 mM	0,4 μ l	0,2 mM
EcoRI+3	10 μ M	1 μ l	0,5 μ M
TruI+3	10 μ M	1 μ l	0,5 μ M
Taq polimeráz	5 U/ μ l	0,2 μ l	1 U
20 μ l végtréfogat MQ vízzel			

Szelektív PCR

94°C	2 min	10 \times , ciklusonként -1 °C
94°C	20 sec	
66–57°C	30 sec	
72°C	2 min	
94°C	20 sec	20 \times
56°C	30 sec	
72°C	2 min	
72°C	2 min	
4°C	∞	

M2.4. AFLP adatelemzés

Az AFLP adatokból nyert távolságmátrix alapján Kruskal-féle NMDS-t végző utasításköteg az R környezet számára.

```
1 library(ade4)
2 library(MASS)
3 rosa<-t(read.table("rosa.nmds.csv",header=TRUE,sep=",",row.names=1))
4 rosa.dat<-data.frame(rosa[,1:ncol(rosa)-1])
5 rosa.dist<-dist.binary(rosa.dat,method=7) #1:Jaccard,5:Dice,7:Ochiai,9:Phi
6 rosa.mds<-isoMDS(rosa.dist)
7 rosa.sh<-Shepard(rosa.dist,rosa.mds$points)
8 plot(rosa.mds$points,pch=rosa[,ncol(rosa)])
9 text(rosa.mds$points,labels=row.names(rosa),pos=1,cex=0.5)
10 plot(rosa.sh,pch=".")
11 lines(rosa.sh$x,rosa.sh$yf,type="l")
```

Az AFLP adatokból különbözőségi indexeket, illetve azokból bootstrap ismétlését számító algoritmus az R statisztikai parancsértelmező környezethez.

```
1 library(ade4)
2 rosa.dat<-data.frame(t(read.table("rosa.csv",header=TRUE,sep=",",row.names=1)[,1:38]))
3 methods<-c(1,5,7) #1:Jaccard,5:Dice,7:Ochiai
4 for(m in methods){
5   rosa.dist<-dist.binary(rosa.dat,method=m)
6   rosa.mat<-as.matrix(rosa.dist)
7   rosa.mat[upper.tri(rosa.mat)]<-NA
8   rosa.mat<-round(rosa.mat,digits=3)
9   cat("38\n",file=paste("boot",m,sep=""))
10  write.table(rosa.mat,file=paste("boot",m,sep=""),col.names=FALSE,quote=FALSE,na="",append=TRUE)
11  x<-c(1:999)
12  col<-c(1:ncol(rosa.dat))
13  for(n in x){
14    temp<-rosa.dat
15    for(col in col){temp[,col]<-rosa.dat[,sample(col,1)]}
16    temp.dist<-dist.binary(temp,method=m)
17    temp.mat<-as.matrix(temp.dist)
18    temp.mat[upper.tri(temp.mat)]<-NA
19    temp.mat<-round(temp.mat,digits=3)
20    cat("38\n",file=paste("boot",m,sep=""),append=TRUE)
21    write.table(temp.mat,file=paste("boot",m,sep=""),col.names=FALSE,quote=FALSE,na="",append=TRUE)
22  }
23 }
```

M2.5. *CelI* protokoll*ITS primerek*

Oligonukleotid	Szekvencia
ITS5	5' -GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'
P2	5' -CTCGATGGAACACGGGATTCTGC-3'

PCR reakcióelegy

Komponens	Törzsoldat	Mennyiség	Végkoncentráció
DNS	30 ng/ μ l	1 μ l	30 ng
PCR puffer	10 \times	5 μ l	1 \times
MgCl ₂	25 mM	3 μ l	1,5 mM
dNTP	10 mM	1 μ l	0,2 mM
ITS5	10 μ M	2 μ l	0,4 μ M
P2	10 μ M	2 μ l	0,4 μ M
Taq DNS-polimeráz	1 U/ μ l	0,5 μ l	0,5 U

50 μ l végtérfogat MQ vízzel*PCR program*

94°C	5min	35 \times
94°C	30 sec	
50°C	30 sec	
72°C	60 sec	
72°C	5min	
4°C	∞	

CelI emésztés

10 μ l PCR termék + 10 μ l referencia PCR termék	
94 °C	10 min
+ 1 μ l <i>CelI</i>	
37 °C	1 óra
+20 μ l FDE	

Denaturáló poliakrilamid gélelektroforézis

Összetevő	Törzsoldat	Mennyiség	Koncentráció
Karbamid		40 g	50 %
TBE	10×	8 ml	1×
Akrlamid – Bisz-akrlamid (19:1)	40 %	24 ml	12 %
80 ml-re kiegészíteni desztillált vízzel, enyhe melegítés			
Ammónium-perszulfát	10 %	480 μ l	
TEMED		32 μ l	

M2.6. Szóló magvatlanság SCAR-RFLP protokoll*SCAR-RFLP primerek*

Primer	Szekvencia
SCC8S	5' –GGTGTCAAGTTGGAAGATGG–3'
SCC8AS	5' –TATGCCAAAAACATCCCC–3'

PCR reakcióelegy

Komponens	Törzsoldat	Mennyiség	Végkoncentráció
DNS	30 ng/μl	1 μl	30 ng
PCR puffer	10×	2 μl	1×
MgCl ₂	25 mM	2 μl	2,5 mM
dNTP	2,5 mM	2 μl	0,25 mM
SCC8S	10 μM	1 μl	0,5 μM
SCC8AS	10 μM	1 μl	0,5 μM
Taq DNS-polimeráz	1 U/μl	1 μl	1 U

20 μl végtérfogat MQ vízzel

PCR program

94°C	5min	35×
94°C	45 sec	
60°C	45 sec	
72°C	90 sec	
72°C	5min	
4°C	∞	

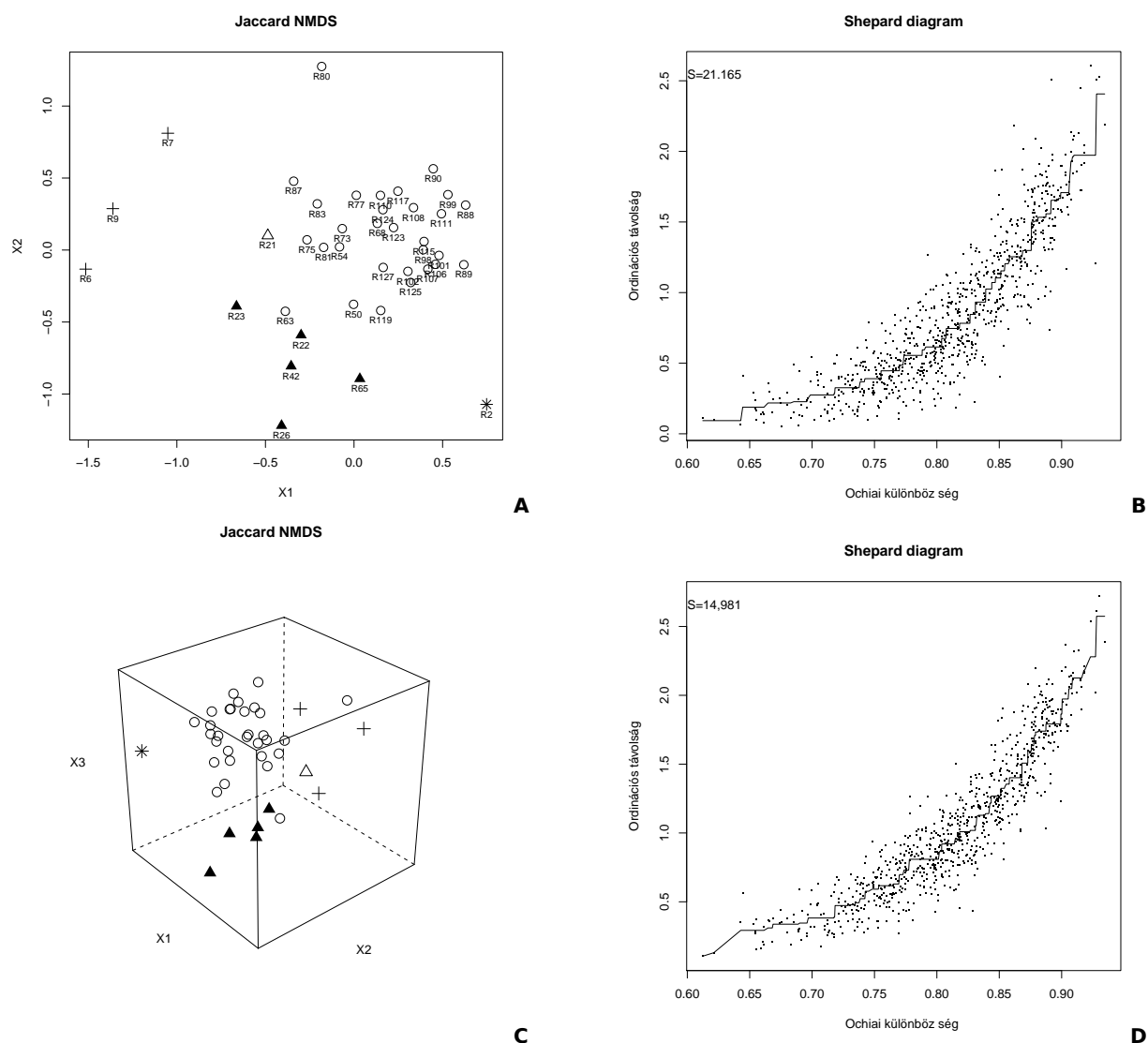
BglII restrikciós emésztés

Komponens	Törzsoldat	Mennyiség	Végkoncentráció
PCR reakciótermék		8,5 μl	
BglII puffer	10×	1 μl	1×
BglII	10 U/μl	0,5 μl	5 U

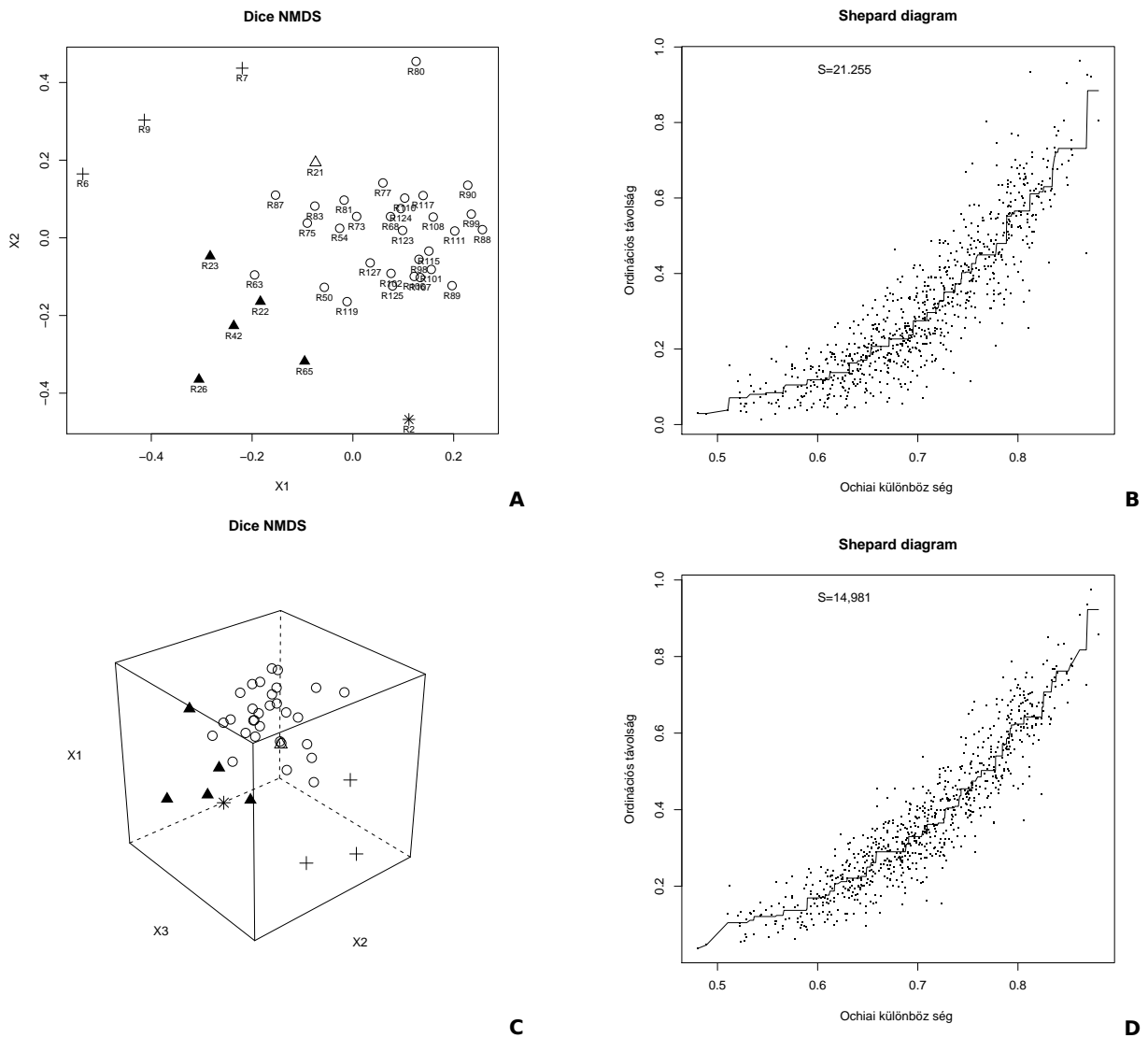
1 óra 37 °C

M3. Kiegészítések az AFLP eredményekhez

M3.1. Ordinációs diagramok

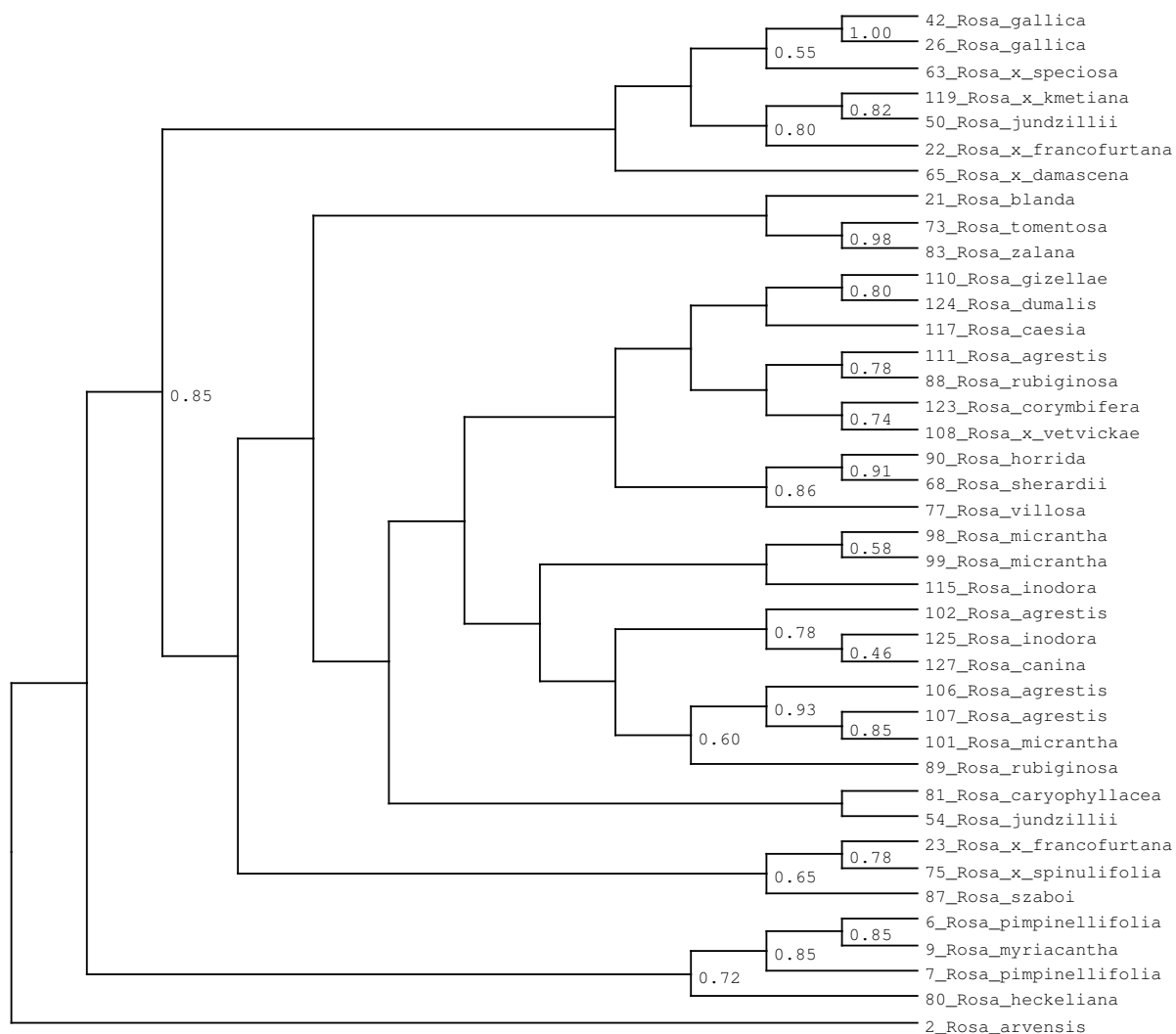


34. ábra: Jaccard különbségességi mutatón alapuló NMDS. (A) A 2 dimenziós NMDS eredményének ábrázolása. Szekciók: csillag – *Synstylae*, kereszt – *Pimpinellifoliae*, sötét háromszög – *Rosa*, világos háromszög – *Cinnamomeae*, világos kör – *Caninae*. (B) A 2 dimenziós NMDS stressz-szintjének ábrázolása Shepard diagramon ($S = 21.165$). Az abszcissza a Jaccard indexet, az ordináta az ordinációban mért távolságot mutatja. A pontok szórásával nő az ordinációt jellemző stressz-érték. (C) A 3 dimenziós, Jaccard indexen alapuló NMDS eredménye. (D) A három dimenziós NMDS Shepard diagramja ($S = 14.981$).

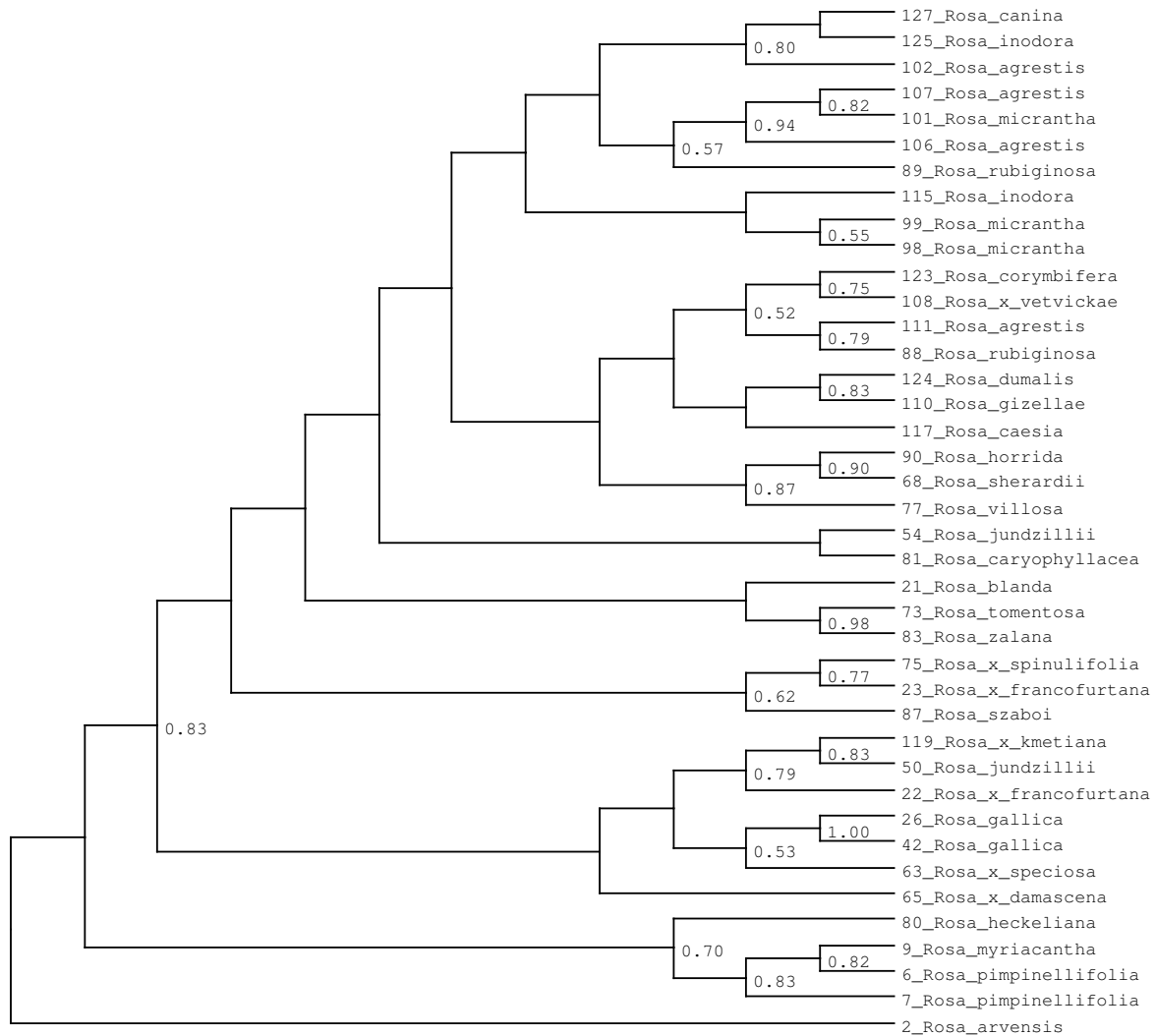


35. ábra: Dice különbözöségi mutatón alapuló NMDS. (A) A 2 dimenziós NMDS eredményének ábrázolása. Szekciók: csillag – *Synstylae*, kereszt – *Pimpinellifoliae*, sötét háromszög – *Rosa*, világos háromszög – *Cinnamomeae*, világos kör – *Caninae*. (B) A 2 dimenziós NMDS stressz-szintjének ábrázolása Shepard diagramon ($S = 21.255$). Az abszcissza a Dice indexet, az ordináta az ordinációban mért távolságot mutatja. A pontok szórásával nő az ordinációt jellemző stressz-érték. (C) A 3 dimenziós, Dice indexen alapuló NMDS eredménye. (D) A három dimenziós NMDS Shepard diagramja ($S = 14,981$).

M3.2. Jaccard és Dice távolságon alapuló UPGMA dendogramok



36. ábra: A 40 Kárpát-medencei rózsaxon rokonsági viszonyait mutató dendrogram. A dendrogram 1 000 véletlenszerűen újravételezett (bootstrap) AFLP adatmátrixból Jaccard távolság-mutató alapján számolt UPGMA fák konszenzusát mutatja. Az egyes csoportok támogatottságát az elágazásoknál feltüntetett bootstrap értékek jelzik.



37. ábra: A 40 Kárpát-medencei rózsa taxon rokonsági viszonyait mutató dendrogram. A dendrogram 1000 véletlenszerűen újravételezett (bootstrap) AFLP adatmátrixból Dice távolság-mutató alapján számolt UPGMA fák konszenzusát mutatja. Az egyes csoportok támogatottságát az elágazásoknál feltüntetett bootstrap értékek jelzik.

M4. Kiegészítő információk a szőlő magvatlanságának markerezéséhez

M4.1. Az SCC8 allélok többszörös illesztése

BC4_1	.TGGTGTC	AAGTTGG	AAGATGGGGAG	TGCTCT	AGTGTC	AGCTCCA	A	ACTTGT	TTACTTT	GGGCA	64
KM_1	TGGTGTC	AAGTTGG	AAGATGGGGAG	TGCTCT	AGTGTC	AGCTCCA	A	ACTTGT	TTACTTT	GGGCA	65
BC4_2	.TGGTGTC	AAGTTGG	AAGATGGGGAG	TGCTCT	AGTGTC	AGCTCCA	A	ACTTGT	TTACTTT	GGGCA	64
KM_9	.TGGTGTC	AAGTTGG	AAGATGGGGAG	TGCTCT	AGTGTC	AGCTCCA	G	ACTTGT	TTACTTT	AGGCA	64
KM_2	.TGGTGTC	AAGTTGG	AAGATGGGGAG	TGCTCT	AGTGTC	AGCTCCA	G	ACTTGT	TTACTTT	GGGCA	64
H1176_10	.TGGTGTC	AAGTTGG	AAGATGGGGAG	TGCTCT	AGTGTC	AGCTCCA	G	ACTTGT	TTACTTT	AGGCA	64
KM_3	.TGGTGTC	AAGTTGG	AAGATGGGGAG	TGCTCT	AGTGTC	AGCTCCA	G	ACTTGT	TTACTTT	AGGCA	64
H1176_11	.TGGTGTC	AAGTTGG	AAGATGGGGAG	TGCTCT	AGTGTC	AGCTCCA	G	ACTTGT	TTACTTT	AGGCA	64
chr18	..GGTGTC	AAGTTGG	AATGGGGAG	TGCTCT	AGTGTC	AGCTCCA	G	ACTTGT	TTACTTT	AGGCA	63
chr19	..GGTGTC	TAGTTGG	GAGATGG	GAG	AGTCTCT	GGTGTCT	G	GCTCCA	GACTTGT	CCGGTTT	64
chr4	..GGTGTC	TAGTTGG	GAGATGGG	AGA	GCTC	GGTGTC	G	ACTCCA	GATTTGT	CTGCTTT	63

Bgl II

BC4_1	CCCTGGGGAAGATCTCATT	GGAACCTTAAAGGAGGGGTGAAGTTT	TGCGAGGCT	AGGGG	121				
KM_1	CCCTGGGGAAGATCTCATT	GGAACCTTAAAGGAGGGGTGAAGTTT	TGCGAGGCT	AGGGG	122				
BC4_2	CCCTGGGGAAGATCTCATT	GGAACCTTAAAGGAGGGGTGAAGTTT	TGCGAGGCT	AGGGG	121				
KM_9	CCCTGGGGAAGATCTCATT	GGAACCTTAAAGGAGGGGTGAAGTTT	TGCGAGGCT	AGGGG	121				
KM_2	CCCTGGGGAAGATCTCATT	GGAACCTTAAAGGAGGGGTGAAGTTT	TGCGAGGCT	AGGGG	121				
H1176_10	CCCTGGGGAAGATCTCATT	GGAACCTTAAAGGAGGGGTGAAGTTT	TGCGAGGCT	AGGGG	121				
KM_3	CCCTGGGGAAGATCTCATT	GGAACCTTAAAGGAGGGGTGAAGTTT	TGCGAGGCT	AGGGG	121				
H1176_11	CCCTGGGGAAGATCTCATT	GGAACCTTAAAGGAGGGGTGAAGTTT	TGCGAGGCT	AGGGG	121				
chr18	CCCTGGGGAAGATCTCATT	GGAACCTTAAAGGAGGGGTGAAGTTT	TGCGAGGCT	AGGGG	120				
chr19	GTCTGGGGAAG	GTTCAT	GTGGAACCTTAAAG	AGGGGTGA	GTTTG	AGAGGCT	GGGGG	121	
chr4	GTGTGGG	GAGATCTCATT	GGAACCTTAAAG	AGGGGGT	AAG	GTTCGAGG	ATGGGGGG	CT	GGGGG	128

BC4_1	CCCC	TTTCATATTGATCGAGTTT	GAGAATAAAGCAGAGGCCA	AAAAAA	.GTGTTA	CTAAAAGGGCT	185				
KM_1	CCCC	TTTCATATTGATCGAGTTT	GAGAATAAAGCAGAGGCCA	AAAAAA	.GTGTTA	CTAAAAGGGCT	186				
BC4_2	CCCC	TTTCATATTGATCGAGTTT	GAGAATAAAGCAGAGGCCA	AAAAAA	.GTGTTA	CTAAAAGGGCT	185				
KM_9	CCCC	TTTCATATTGATCGAGTTT	GAGAATAAAGCAGAGGCCA	AAAAAA	AGTGT	TACTAAAAGGGCT	186				
KM_2	CCCC	TTTCATATTGATCGAGTTT	GAGAATAAAGCAGAGGCCA	AAAAAA	.GTGTTA	CTAAAAGGGCT	185				
H1176_10	CCCC	TTTCATATTGATCGAGTTT	GAGAATAAAGCAGAGGCCA	AAAAAA	AGTGT	TACTAAAAGGGCT	186				
KM_3	CCCC	TTTCATATTGATCGAGTTT	GAGAATAAAGCAGAGGCCA	AAAAAA	AGTGT	TACTAAAAGGGCT	186				
H1176_11	CCCC	TTTCATATTGATCGAGTTT	GAGAATAAAGCAGAGGCCA	AAAAAA	AGTGT	TACTAAAAGGGCT	186				
chr18	CCCC	TTTCATATTGATCGAGTTT	GAGAATAAAGCAGAGGCCA	AAAAAA	AGTGT	TACTAAAAGGGCT	185				
chr19	GTTC	TTTCATATTGATCGAGTTT	GAGAATAAAGCA	AGTTC	CAAAAA	.GTGTTA	TAAAAGGGCT	185			
chr4	GTTC	TTTCATA	GTGTT	GAGTTT	GAGAAT	GAG	TAGAGGCCA	GAGGAG	.GTGTTA	TAAAGAGGGCT	192

BC4_1	TCGTTGTTTTAAGGAATCGTTTCT	CACCTTGG	TAAAGGT	AGGACCCAAAAAGT	AGGGTGTTCT	AAAA	250		
KM_1	TCGTTGTTTTAAGGAATCGTTTCT	CACCTTGG	TAAAGGT	AGGACCC	NAAAGT	AGGGNGTCT	AAAA	251	
BC4_2	TCGTTGTTTTAAGGAATCGTTTCT	CACCTTGG	TAAAGGT	AGGACCCAAAAAGT	AGGGTGTTCT	AAAA	250		
KM_9	TCGTTGTTTTAAGGAATCGTTTCT	CACCTTGG	TAAAGGT	AGGACCCAAAAAGT	AGGGTGTTCT	AAAA	251		
KM_2	TCGTTGTTTTAAGGAATCGTTTCT	CACCTTGG	TAAAGGT	AGGACCCAAAAAGT	AGGGTGTTCT	AAAA	250		
H1176_10	TCGTTGTTTTAAGGAATCGTTTCT	CACCTTGG	TAAAGGT	AGGACCCAAAAAGT	AGGGTGTTCT	AAAA	251		
KM_3	TCGTTGTTTTAAGGAATCGTTTCT	CACCTTGG	TAAAGGT	AGGACCCAAAAAGT	AGGGTGTTCT	AAAA	251		
H1176_11	TCGTTGTTTTAAGGAATCGTTTCT	CACCTTGG	TAAAGGT	AGGACCCAAAAAGT	AGGGTGTTCT	AAAA	251		
chr18	TCGTTGTTTTAAGGAATCGTTTCT	CACCTTGG	TAAAGGT	AGGACCCAAAAAGT	AGGGTGTTCT	AAAA	250		
chr19	TCGTTGTTTTAAGGAATCGTTTCT	CACCTTGG	TAAAGGT	GGGACCCAAAAAGT	GGGGTGTT	TT	CAAA	250	
chr4	TC	TTTGTTTTAAGGAATCGTTTCT	CACCTTGG	AAAA	TGT	GGGACCCAAAAAGT	GGGGTGTTCT	CAAA	257

BC4_1	ATTGTGAGC	AAGTTAAGGAAG	CTTG.....	G	GTGAGAGTAGT	AGGTTTACC	GTTGCATT	304	
KM_1	ATTGTGAGC	AAGTTAAGGAAG	CTTG.....	G	GTGAGAGTAGT	AGGTTTACC	GTTGCATT	305	
BC4_2	ATTGTGAGC	AAGTTAAGGAAG	CTTG.....	G	GTGAGAGTAGT	AGGTTTACC	GTTGCATT	304	
KM_9	ATTGTGAGC	AAGTTAAGGAAG	CTTG.....	G	GTGAGAGTAGT	AGGTTTACC	GTTGCATT	305	
KM_2	ATTGTGAGC	AAGTTAAGGAAG	CTTG.....	G	GTGAGAGTAGT	AGGTTTACC	GTTGCATT	304	
H1176_10	ATTGTGAGC	AAGTTAAGGAAG	CTTG.....	G	GTGAGAGTAGT	AGGTTTACC	GTTGCATT	305	
KM_3	ATTGTGAGC	AAGTTAAGGAAG	CTTG.....	G	GTGAGAGTAGT	AGGTTTACC	GTTGCATT	305	
H1176_11	ATTGTGAGC	AAGTTAAGGAAG	CTTG.....	G	GTGAGAGTAGT	AGGTTTACC	GTTGCATT	305	
chr18	ATTGTGAGC	AAGTTAAGGAAG	CTTG.....	G	GTGAGAGTAGT	AGGTTTACC	GTTGCATT	304	
chr19	ATTGTGAG	TGAGTTTTTTTT	TTTTTTTTTTTT	G	GTGAGAGTAGT	GGGTTTACC	GTGCACT	315	
chr4	ATGTGAGC	CAGTTAAGGAAG	TTTG.....	G	GTGAGAGTAGT	GGGCTTCC	GTTGCATT	311	
BC4_1	TATAGAGTCGAGAAGTGT	TTAGAAAGATTA	AGGAAGGTTTGT	GGGG.	TTTGTTCAGTGGATGA	368			
KM_1	TATAGAGTCGAGAAGTGT	TTAGAAAGATTA	AGGAAGGTTTGT	GGGG.	TTTGTTCAGTGGATGA	369			
BC4_2	TATAGAGTCGAGAAGTGT	TTAGAAAGATTA	AGGAAGGTTTGT	GGGG.	TTTGTTCAGTGGATGA	368			
KM_9	TATAGAGTCGAGAAGTGT	TTAGAAAGATTA	AGGAAGGTTTGT	GGGG.	TTTGTTCAGTGGATGA	369			
KM_2	TATAGAGTCGAGAAGTGT	TTAGAAAGATTA	AGGAAGGTTTGT	GGGG.	TTTGTTCAGTGGATGA	368			
H1176_10	TATAGAGTCGAGAAGTGT	TTAGAAAGATTA	AGGAAGGTTTGT	GGGG.	TTTGTTCAGTGGATGA	369			
KM_3	TATAGAGTCGAGAAGTGT	TTAGAAAGATTA	AGGAAGGTTTGT	GGGG.	TTTGTTCAGTGGATGA	369			
H1176_11	TATAGAGTCGAGAAGTGT	TTAGAAAGATTA	AGGAAGGTTTGT	GGGG.	TTTGTTCAGTGGATGA	369			
chr18	TATAGAGTCGAGAAGTGT	TTAGAAAGATTA	AGGAAGGTTTGT	GGGG.	TTTGTTCAGTGGATGA	368			
chr19	TTTGGAGTCGAGAAGTGT	TTAGAAAGATTA	AGGAAGGTTTGT	GGGG.	TTTGTTCAGTGGATGA	380			
chr4	TTTGGAGTCGAGAAGTGT	TTAGAAAGATTA	AGGAAGGTTTGT	GGGG.	TTTGTTCAGTGGATGA	375			
BC4_1	AAACA	CTGTTGCTTTTAA	AGAGCTTCAATG	AGCTAGAAT	TTTAGTGAAATCTGAG	TGGTTA	CAGT	433	
KM_1	AAACA	CTGTTGCTTTTAA	AGAGCTTCAATG	AGCTAGAAT	TTTAGTGAAATCTGAG	TGGTTA	CAGT	434	
BC4_2	AAACA	CTGTTGCTTTTAA	AGAGCTTCAATG	AGCTAGAAT	TTTAGTGAAATCTGAG	TGGTTA	CAGT	433	
KM_9	AAACA	CTGTTGCTTTTAA	AGAGCTTCAATG	AGCTAGAAT	TTTAGTGAAATCTGAG	TGGTTA	CAGT	434	
KM_2	AAACA	CTGTTGCTTTTAA	AGAGCTTCAATG	AGCTAGAAT	TTTAGTGAAATCTGAG	TGGTTA	CAGT	433	
H1176_10	AAACA	CTGTTGCTTTTAA	AGAGCTTCAATG	AGCTAGAAT	TTTAGTGAAATCTGAG	TGGTTA	CAGT	434	
KM_3	AAACA	CTGTTGCTTTTAA	AGAGCTTCAATG	AGCTAGAAT	TTTAGTGAAATCTGAG	TGGTTA	CAGT	434	
H1176_11	AAACA	CTGTTGCTTTTAA	AGAGCTTCAATG	AGCTAGAAT	TTTAGTGAAATCTGAG	TGGTTA	CAGT	434	
chr18	AAACA	CTGTTGCTTTTAA	AGAGCTTCAATG	AGCTAGAAT	TTTAGTGAAATCTGAG	TGGTTA	CAGT	434	
chr19	AGACA	CTGCTACTTTTAA	GAGCTTCAATG	GCTAGAAT	ATTAGTGAAATCTGAG	GATTAA	CAGT	445	
chr4	AGACA	CTGTTGCTTTTAA	GAGCTTCAATG	GCTAGAAT	ATTAGTGAAATCTGAG	GATTAA	CAGT	440	
BC4_1	GGCCAAGCT	ATTGTCAGGTGGTAGTTGGCTCTT	TTGTTTTTCTATT	TAA	TGTG.....	488			
KM_1	GGCCAAGCT	ATTGTCAGGTGGTAGTTGGCTCTT	TTGTTTTTCTATT	TAA	TGTG.....	489			
BC4_2	GGCCAAGCT	ATTGTCAGGTGGTAGTTGGCTCTT	TTGTTTTTCTATT	TAA	TGTG.....	488			
KM_9	GGCCAAGCT	ATTGTCAGGTGGTAGTTGGCTCTT	TTGTTTTTCTATT	TAA	TGTG.....	489			
KM_2	GGCCAAGCT	ATTGTCAGGTGGTAGTTGGCTCTT	TTGTTTTTCTATT	TAA	TGTG.....	488			
H1176_10	GGCCAAGCT	ATTGTCAGGTGGTAGTTGGCTCTT	TTGTTTTTCTATT	TAA	TGTG.....	489			
KM_3	GGCCAAGCT	ATTGTCAGGTGGTAGTTGGCTCTT	TTGTTTTTCTATT	TAA	TGTG.....	489			
H1176_11	GGCCAAGCT	ATTGTCAGGTGGTAGTTGGCTCTT	TTGTTTTTCTATT	TAA	TGTG.....	489			
chr18	GGCCAAGCT	ATTGTCAGGTGGTAGTTGGCTCTT	TTGTTTTTCTATT	TAA	TGTG.....	488			
chr19	GGCCAACT	TTTGCAGGTGGTAGTTGGCTCTT	TTGTTTTTCTATT	CAG	CTGTG	GTGGGAGGTG	510		
chr4	AGCCAAGCT	CTTTGTCAGGTGGTAGTTGGCTCTT	CTTTTCTATT	CAG	CTGTG	GTGGGAGGTG	505		
BC4_1	TCAAAAGTTCTTCC	AGTGATTA	GAAGTGG	AATG	AGAAATGAGTAGGAGGTTAG	541		
KM_1	TCAAAAGTTCTTCC	AGTGATTA	GAAGTGG	AATG	AGAAATGAGTAGGAGGTTAG	542		
BC4_2	TCAAAAGTTCTTCC	AGTGATTA	GAAGTGG	AATG	AGAAATGAGTAGGAGGTTAG	541		
KM_9	TCAAAAGTTCTTCC	AGTGATTA	GAAGTGG	AATG	AGAAATGAGTAGGAGGTTAG	542		
KM_2	TCAAAAGTTCTTCC	AGTGATTA	GAAGTGG	AATG	AGAAATGAGTAGGAGGTTAG	541		
H1176_10	TCAAAAGTTCTTCC	AGTGATTA	GAAGTGG	AATG	AGAAATGAGTAGGAGGTTAG	542		
KM_3	TCAAAAGTTCTTCC	AGTGATTA	GAAGTGG	AATG	AGAAATGAGTAGGAGGTTAG	542		
H1176_11	TCAAAAGTTCTTCC	AGTGATTA	GAAGTGG	AATG	AGAAATGAGTAGGAGGTTAG	542		
chr18	TCAAAAGTTCTTCC	AGTGATTA	GAAGTGG	AATG	AGAAATGAGTAGGAGGTTAG	541		
chr19	CAACCAAGGGTG	TCAAAAGTTGCTCTGTA	TTGAAGTGG	GATG	AGAAATGAGTAG	AGGTTAG	575		
chr4	TAACCAAGGGTG	TAGGAATGGCTCTGTA	TTGAAGTGG	GATG	AGAAATGAGTAG	AGGTTAG	570		
BC4_1	GGATGATGGA	.GGG	ACGGTTTAC	GCGCA	ATTGTGAAT	ATGGAG	CAAGTAC	AACTCATTGGCAGT	605
KM_1	GGATGATGGA	.GGG	ACGGTTTAC	GCGCA	ATTGTGAAT	ATGGAG	CAAGTAC	AACTCATTGGCAGT	606
BC4_2	GGATGATGGA	.GGG	ACGGTTTAC	GCGCA	ATTGTGAAT	ATGGAG	CAAGTAC	AACTCATTGGCAGT	605
KM_9	GGATGATGGA	.GGG	ACGGTTTAC	GCGCA	ATTGTGAAT	ATGGAG	CAAGTAC	AACTCATTGGCAGT	606
KM_2	GGATGATGGA	.GGG	ACGGTTTAC	GCGCA	ATTGTGAAT	ATGGAG	CAAGTAC	AACTCATTGGCAGT	606
H1176_10	GGATGATGGA	.GGG	ACGGTTTAC	GCGCA	ATTGTGAAT	ATGGAG	CAAGTAC	AACTCATTGGCAGT	606
KM_3	GGATGATGGA	.GGG	ACGGTTTAC	GCGCA	ATTGTGAAT	ATGGAG	CAAGTAC	AACTCATTGGCAGT	606
H1176_11	GGATGATGGA	.GGG	ACGGTTTAC	GCGCA	ATTGTGAAT	ATGGAG	CAAGTAC	AACTCATTGGCAGT	606
chr18	GGATGATGGA	.GGG	ACGGTTTAC	GCGCA	ATTGTGAAT	ATGGAG	CAAGTAC	AACTCATTGGCAGT	605
chr19	GGATGATGGA	.GGG	ACGGTTTAC	GCGCA	ATTGTGAAT	ATGGAG	CAAGTAC	AACTCATTGGCAGT	640
chr4	GAATGATGAGGGGG	GTGGTTTAC	GCGTCTTTG	TTGTGAAT	GTGGAG	CAGGTACA	CACTCA	TGGT	633

M4. Kiegészítő információk a szőlő magvatlanságának markerezéséhez

BC4_1	CTGCAAAGGTGGCTATGACGTGCGAAATTGGAGAAGTTTGTTCAGAAAAAGATAGGAAGACTGCT	670
KM_1	CTGCAAAGGTGGCTATGACGTGCGAAATTGGAGAAGTTTGTTCAGAAAAAGATAGGAAGACTGCT	671
BC4_2	CTGCAAAGGTGGCTATGACGTGCGAAATTGGAGAAGTTTGTTCAGAAAAAGATAGGAAGACTGCT	670
KM_9	CTGCAAAGGTGGCTATGACGTGCGAAATTGGAGAAGTTTGTTCAGAAAAAGATAGGAAGACTGCT	671
KM_2	CTGCAAAGGTGGCTATGACGTGCGAAATTGGAGAAGTTTGTTCAGAAAAAGATAGGAAGACTGCT	671
H1176_10	CTGCAAAGGTGGCTATGACGTGCGAAATTGGAGAAGTTTGTTCAGAAAAAGATAGGAAGGTTGCT	671
KM_3	CTGCAAAGGTGGCTATGACGTGCGAAATTGGAGAAGTTTGTTCAGAAAAAGATAGGAAGGTTGCT	671
H1176_11	CTGCAAAGGTGGCTATGACGTGCGAAATTGGAGAAGTTTGTTCAGAAAAAGATAGGAAGGTTGCT	671
chr18	CTGCAAAGGTGGCTATGACGTGCGAAATTGGAGAAGTTTGTTCAGAAAAAGATAGGAAGGTTGCT	670
chr19	CTGCAAAGGTGGCTATGACGTGCGAAATTGGAGAAGTTTGTTCAGAAAAAGATAGGAAGGTTGCT	705
chr4	TTGCAAAGGTGGTTGATGACGTGCGAAATTGGAGAAGTTTGTTCAGAAAAAGATAGGAAGACTGCT	700

BC4_1	TCCTCTGACT..GTGTC AACAAAGAGGG.CGATGACGAAGGGATAAAGAGGAA TTGTGGAATATGA	732
KM_1	TCCTCTGACT..GTGTC AACAAAGAGGG.CGATGACGAAGGGATAAAGAGGAA TTGTGGAATATGA	733
BC4_2	TCCTCTGACT..GTGTC AACAAAGAGGG.CGATGACGAAGGGATAAAGAGGAA TTGTGGAATATGA	732
KM_9	TCCTCTGACT..GTGTC AACAAAGAGGG.CGATGACGAAGGGATAAAGAGGAA TTGTGGAATATGA	733
KM_2	TCCTCTGACT..GTGTC AACAAAGAGGG.CGATGACGAAGGGATAAAGAGGAA TTGTGGAATATGA	733
H1176_10	TCCTCTGACT..GTGTC AACAAAGAGGG.CGATGACGAAGGGATAAAGAGGAA TTGTGGAATATGA	733
KM_3	TCCTCTGACT..GTGTC AACAAAGAGGG.CGATGACGAAGGGATAAAGAGGAA TTGTGGAATATGA	733
H1176_11	TCCTCTGACT..GTGTC AACAAAGAGGG.CGATGACGAAGGGATAAAGAGGAA TTGTGGAATATGA	733
chr18	TCCTCTGACT..GTGTC AACAAAGAGGG.CGATGACGAAGGGATAAAGAGGAA TTGTGGAATATGA	732
chr19	ACCTTTGACTTTGTGTCGGCAAGAGGGCAAGAGACGAAGGTTAGAGGAA GGATGCTCTAA	770
chr4	CTCTCTGATTTTGTGTCGGCAAGAGGGCAAGAGACGAAGGTTAGAGGCAAGGG....TGAGTCTAT	761

Bgl II

BC4_1	TAAAGAGAAAGTCTCAGTTGACGAGCCTGTGCCCCAAGGTAGTAGTAATCTTTGGGTGGGT TTGA	797
KM_1	TAAAGAGAAAGTCTCAGTTGACGAGCCTGTGCCCCAAGGTAGTAGTAATCTTTGGGTGGGT TTGA	798
BC4_2	TAAAGAGAAAGTCTCAGTTGACGAGCCTGTGCCCCAAGGTAGTAGTAATCTTTGGGTGGGT TTGA	797
KM_9	TAAAGAGAAAGTCTCAGTTGACGAGCCTGTGCCCCAAGGTAGTAGTAATCTTTGGGTGGGT TTGA	798
KM_2	TAAAGAGAAAGTCTCAGTTGACGAGCCTGTGCCCCAAGGTAGTAGTAATCTTTGGGTGGGT TTGA	798
H1176_10	TAAAGAGAAAGTCTCAGTTGACGAGCCTGTGCCCCAAGGTAGTAGTAATCTTTGGGTGGGT TTGA	798
KM_3	TAAAGAGAAAGTCTCAGTTGACGAGCCTGTGCCCCAAGGTAGTAGTAATCTTTGGGTGGGT TTGA	798
H1176_11	TAAAGAGAAAGTCTCAGTTGACGAGCCTGTGCCCCAAGGTAGTAGTAATCTTTGGGTGGGT TTGA	798
chr18	TAAAGAGAAAGTCTCAGTTGACGAGCCTGTGCCCCAAGGTAGTAGTAATCTTTGGGTGGGT TTGA	797
chr19	TGGGAGGAGGTCTCAATTGAAGGCTTTAGCCCCAAGGTAGTAGTCTTTTGGGTGGGT AATGG	835
chr4	TGGGATGAGGCTCTCAATTAACAGGCTGTAGCTCAAGGATTAGATTTTGGGTGGGT AAGGG	826

BC4_1	AGTTGGATGTAGAGAGGAGACCCATCTAGTCTGAGGATGGCCAAGCCAGCAGC ACTTTAAAGAC	862
KM_1	AGTTGGATGTAGAGAGGAGACCCATCTAGTCTGAGGATGGCCAAGCCAGCAGC ACTTTAAAGAC	863
BC4_2	AGTTGGATGTAGAGAGGAGACCCATCTAGTCTGAGGATGGCCAAGCCAGCAGC ACTTTAAAGAC	862
KM_9	AGTTGGATGTAGAGAGGAGACCCATCTAGTCTGAGGATGGCCAAGCCAGCAGC ACTTTAAAGAC	863
KM_2	AGTTGGATGTAGAGAGGAGACCCATCTAGTCTGAGGATGGCCAAGCCAGCAGC ACTTTAAAGAC	863
H1176_10	AGTTGGATGTAGAGAGGAGACCCATCTAGTCTGAGGATGGCCAAGCCAGCAGC ACTTTAAAGAC	863
KM_3	AGTTGGATGTAGAGAGGAGACCCATCTAGTCTGAGGATGGCCAAGCCAGCAGC ACTTTAAAGAC	863
H1176_11	AGTTGGATGTAGAGAGGAGACCCATCTAGTCTGAGGATGGCCAAGCCAGCAGC ACTTTAAAGAC	863
chr18	AGTTGGATGTAGAGAGGAGACCCATCTAGTCTGAGGATGGCCAAGCCAGCAGC ACTTTAAAGAC	862
chr19	AGTTGGATGTAGAGAGGAGACCCATCTAGTCTGAGGATGGCCAAGCCAGCAGC ACTTTAAAGAC	900
chr4	AGTTGGTTGTAGAGAGGAGACCCAACTGTCTGAGGATGGCCAAGATTAGCAGCGCTTAAAAGAC	885




BC4_1	CCCTGGAAGTGGGTTCGACCCATGCTGACTCTTTAAAGGTCCAGTGTGGTGAGCCAAACCCTC	927
KM_1	CCCTGGAAGTGGGTTCGACCCATGCTGACTCTTTAAAGGTCCAGTGTGGTGAGCCAAACCCTC	928
BC4_2	CCCTGGAAGTGGGTTCGACCCATGCTGACTCTTTAAAGGTCCAGTGTGGTGAGCCAAACCCTC	927
KM_9	CCCTGGAAGTGGGTTCGACCCATGCTGACTCTTTAAAGGTCCAGTGTGGTGAGCCAAACCCTC	928
KM_2	CCCTGGAAGTGGGTTCGACCCATGCTGACTCTTTAAAGGTCCAGTGTGGTGAGCCAAACCCTC	928
H1176_10	CCCTGGAAGTGGGTTCGACCCATGCTGACTCTTTAAAGGTCCAGTGTGGTGAGCCAAACCCTC	928
KM_3	CCCTGGAAGTGGGTTCGACCCATGCTGACTCTTTAAAGGTCCAGTGTGGTGAGCCAAACCCTC	928
H1176_11	CCCTGGAAGTGGGTTCGACCCATGCTGACTCTTTAAAGGTCCAGTGTGGTGAGCCAAACCCTC	928
chr18	CCCTGGAAGTGGGTTCGACCCATGCTGACTCTTTAAAGGTCCAGTGTGGTGAGCCAAACCCTC	927
chr19	CCATGGAAGTGGGTTCGACCCATGCTGACTCTTTAAAGGTCCAGTGTGGTGAGCCAAACCCTC	965
chr4	TTTTTGGGAAGTGGGTTCGACCCAACTGCTGACTCTTTAAAGGTCCAGTGTGGTGAGCCAAACCCTC	950

BC4_1	TTTTGAAGCCTTGAATAGGGCTAGGGCTCGCAAGGGCCTTAGAGACGTTGACTGTGGGAGGC TAT	992
KM_1	TTTTGAAGCCTTGAATAGGGCTAGGGCTCGCAAGGGCCTTAGAGACGTTGACTGTGGGAGGC TAT	993
BC4_2	TTTTGAAGCCTTGAATAGGGCTAGGGCTCGCAAGGGCCTTAGAGACGTTGACTGTGGGAGGC TAT	992
KM_9	TTTTGAAGCCTTGAATAGGGCTAGGGCTCGCAAGGGCCTTAGAGACGTTGACTGTGGGAGGC TAT	993
KM_2	TTTTGTAGCCTTGAATAGGGCTAGGGCTCGCAAGGGCCTTAGAGACGTTGACTGTGGGAGGC TAT	993
H1176_10	TTTTGTAGCCTTGAATAGGGCTAGGGCTCGCAAGGGCCTTAGAGACGTTGACTGTGGGAGGC TAT	993
KM_3	TTTTGTAGCCTTGAATAGGGCTAGGGCTCGCAAGGGCCTTAGAGACGTTGACTGTGGGAGGC TAT	993
H1176_11	TTTTGTAGCCTTGAATAGGGCTAGGGCTCGCAAGGGCCTTAGAGACGTTGACTGTGGGAGGC TAT	993
chr18	TTTTGTAGCCTTGAATAGGGCTAGGGCTCGCAAGGGCCTTAGAGACGTTGACTGTGGGAGGC TAT	992
chr19	TGTTAAGCCTTAAAAGGGCTAGGGCTCGCAAGGGCCTTAGAGACGTTGACTGTGGGAGGC CAG	1029
chr4	TGTTGAAGCCTTAAATGGGGTTAAGGCTTCGCGGGGCTTCA.....TGACTGTGGGAGGC CAG	1009

```

BC4_1      ACGGGGATGTTTTTGGCATAA 1013
KM_1       ACGGGGATGTTTTTGGCATAA 1014
BC4_2      ACGGGGATGTTTTTGGCATAA 1013
KM_9       ACGGGGATGTTTTTGGCATAA 1014
KM_2       ACGGGGATGTTTTTGGCATAA 1014
H1176_10   ACGGGGATGTTTTTGGCATAA 1014
KM_3       ACGGGGATGTTTTTGGCATAA 1014
H1176_11   ACGGGGATGTTTTTGGCATAA 1014
chr18      ACGGGGATGTTTTTGGCATCC 1013
chr19      ACGGGGATGTTTTTGGCATC. 1049
chr4       ACGGGGATGTTTTTGGCATCC 1030

```

 non conserved
 ≥ 50% conserved
 ≥ 90% conserved

M4.2. Szőlő magvatlanságaért felelős génjelöltek

12. táblázat: A szőlő 18. kapcsoltsági csoportjának a magvatlanság domináns *SdI* génjéhez kapcsolt markerek által határolt 2 Mb hosszúságú szakaszán található automatikusan annotált gének.

GAZE annotáció ^a	Annotációs pont	Fehérje találat ^b	Vitis cDNS ^c	Nem Vitis EST ^d	Vitis EST ^e	Funkció ^f
GSVIVG00026031001	11,2072		1	10	2	
GSVIVG00026030001	30,0052			57	2	
GSVIVG00026029001	20,4241			4		
GSVIVG00026028001	4,0773					
GSVIVG00026027001	20,3501	1			1	F-Box protein-2C putative
GSVIVG00026026001	1,0824				1	
GSVIVG00026025001	14,8325	3		3		Probable selenium-binding protein
GSVIVG00026024001	1,4288				2	
GSVIVG00026022001	25,0591			9	2	
GSVIVG00026021001	27,6948	10		9	5	Receptor-like protein kinase
GSVIVG00026020001	14,2263	10		15	8	Receptor protein kinase like protein
GSVIVG00026019001	14,3443				1	
GSVIVG00026018001	7,4156			2	2	
GSVIVG00026016001	5,5897	6		5	3	Receptor protein kinase like protein
GSVIVG00026015001	114,115	2	2	40	8	Putative uncharacterized protein F28P58
GSVIVG00026014001	313,409	163		881	17	Heat shock protein 70
GSVIVG00026012001	51,2739	2		4	5	AT5g23810-2FMRO11-15
GSVIVG00026011001	40,2954	1		1		Putative uncharacterized protein
GSVIVG00026010001	1,7815	4	4	9	18	Expressed protein, phosphatase inhibitor (medicago truncatula)
GSVIVG00026009001	100,225	8	1	23		Amino acid permease 1-2C putative-2C expressed
GSVIVG00026008001	190,7	15	1	208	29	Probable adenylate kinase 2-2C chloroplast precursor
GSVIVG00026007001	6,4602	7		34	11	Receptor kinase-like protein

Folytatás a következő oldalon

M4. Kiegészítő információk a szőlő magvatlanságának markerezéséhez

Folytatás az előző oldalról						
GAZE annotáció ^a	Annotációs pont	Fehérje találat ^b	Vitis cDNS ^c	Nem Vitis EST ^d	Vitis EST ^e	Funkció ^f
GSVIVG00026003001	53,5539				9	
GSVIVG00026001001	14,1269				4	
GSVIVG00026000001	78,2451	12	3	94	20	Leucine-rich repeat receptor-like kinase At1g09970
GSVIVG00025999001	461,707	7	2	152	29	Translocon Tic40-like protein
GSVIVG00025997001	11,7289		1		13	
GSVIVG00025995001	-0,4					
GSVIVG00025994001	35,4851				7	
GSVIVG00025993001	1,4802			18	6	
GSVIVG00025992001	16,3316	1		42	20	Disease resistance protein
GSVIVG00025990001	5,4424	1		39	3	Cys-2FMet metabolism PLP-dependent enzyme family protein-2C expressed
GSVIVG00025989001	21,7817	1			4	Predicted protein
GSVIVG00025988001	2,9333	1		11	2	Putative uncharacterized protein F11C1-210
GSVIVG00025987001	17,2272			1	2	
GSVIVG00025986001	37,1224			5	5	
GSVIVG00025984001	82,3154	5		144	6	ATP synthase subunit alpha
GSVIVG00025983001	51,9338	4		92	12	Taxoid 7-beta-hydroxylase
GSVIVG00025981001	37,412	3		107	16	ATP synthase subunit beta
GSVIVG00025978001	7,9268	14		1514	37	Tubulin beta chain: TUB5
GSVIVG00025977001	38,1008				7	
GSVIVG00025975001	36,4381	3		22	2	Taxadiene 5-alpha hydroxylase
GSVIVG00025974001	19,9667			51	4	
GSVIVG00025972001	4,9716				9	
GSVIVG00025969001	36,7161				3	
GSVIVG00025968001	39,0762	1			1	Uncharacterized protein At5g183701
GSVIVG00025967001	37,4638				6	
GSVIVG00025965001	2,7774				7	
GSVIVG00025963001	15,9233				1	
GSVIVG00025962001	31,099	3		6	8	Glucose-6-phosphate isomerase
GSVIVG00025961001	23,6681			6	1	
GSVIVG00025960001	17,9912			1		
GSVIVG00025959001	25,4087	1		7	2	Glucose-6-phosphate isomerase
GSVIVG00025958001	121,15			1	4	
GSVIVG00025957001	14,2138			3		
GSVIVG00025955001	9,1657	1		9	1	Resistance gene-like
GSVIVG00025953001	33,5758	2		49	2	Similarity to cytochrome P450
GSVIVG00025952001	36,8263			59	4	
GSVIVG00025951001	5,5217			6	1	
GSVIVG00025950001	329,583	8		118	9	Phosphoglycerate dehydrogenase-2C putative-3B 33424-31403
na				19	15	
GSVIVG00025948001	178,095	5		170	11	Putative host response protein
GSVIVG00025947001	218,326	18	9	363	75	Disease resistance protein AIG1-3B 5333-4002

Folytatás a következő oldalon

9. Mellékletek

Folytatás az előző oldalról

GAZE annotáció ^a	Annotációs pont	Fehérje találat ^b	Vitis cDNS ^c	Nem Vitis EST ^d	Vitis EST ^e	Funkció ^f
GSVIVG00025946001	202,934	6	3	77	7	Dephospho-CoA kinase family protein
GSVIVG00025945001	292,246	76		256	48	MADS-box protein 5
GSVIVG00025943001	49,0996	1		6	8	Putative uncharacterized protein
GSVIVG00025941001	196,702	10	4	1767	83	Elongation factor 1 gamma
na		2		8	10	Putative NADH-dependent glutamate synthase
GSVIVG00025937001	20,753	1		8	2	cDNA FLJ30483 fis-2C clone BRAWH2000048-2C highly similar to Mus musculus kinesin motor protein KIFC2 mRNA
GSVIVG00025936001	24,5432	8		15	12	DYW9 protein
GSVIVG00025934001	266,085	5		84	12	Cation exchanger-like protein
GSVIVG00025931001	1,3019				2	
GSVIVG00025930001	172,542	113		818	4	Putative 12-oxophytodienoate reductase-like protein 2
GSVIVG00025929001	184,587	125		786	36	Putative 12-oxophytodienoic acid reductase
GSVIVG00025927001	35,6213		na	na	na	
GSVIVG00025926001	183,169	128		1372	16	Putative 12-oxophytodienoate reductase-like protein 2
GSVIVG00025925001	186,823	129		733	41	12-oxophytodienoic acid 10-2C 11-reductase
GSVIVG00025923001	241,442	131		832	44	12-oxophytodienoate reductase 1
GSVIVG00025922001	44,2064	1		32	4	12-oxo-phytodienoic acid reductase
GSVIVG00025921001	48,6481			71	3	
GSVIVG00025920001	8,9711			6		
GSVIVG00025919001	136,723	4	3	67	9	Uncharacterized protein At4g099651
GSVIVG00025918001	34,7077	4		5	19	Sucrose-phosphate synthase isoform C
GSVIVG00025917001	-0,4					
GSVIVG00025916001	97,041	8		43	4	MADS-box 11
GSVIVG00025914001	182,899	9	7	159	22	Putative GDSL-motif lipase-2Fhydrolase-3B 24593-26678
GSVIVG00025913001	150,624	10	1	80	2	F14M27 protein
GSVIVG00025912001	145,712			19	4	
GSVIVG00025911001	11,2524	1		48	2	Putative uncharacterized protein OSJNBb0013K081
GSVIVG00025910001	26,5845			43	3	
GSVIVG00025908001	7,4625	2		76		Homogentisate prenyltransferase
GSVIVG00025907001	7,3507					
GSVIVG00025906001	97,3194	4		93	23	Putative uncharacterized protein
GSVIVG00025904001	3,7795				2	
GSVIVG00025902001	195,165	2		6	2	ABC2 homolog 7
GSVIVG00025901001	12,2108			3	1	
GSVIVG00025900001	102,969	17		676	30	Uncharacterized protein At1g766802
GSVIVG00025899001	43,2648				1	
GSVIVG00025898001	13,6577				2	
GSVIVG00025897001	22,0519				2	
GSVIVG00025896001	44,9034				3	

Folytatás a következő oldalon

Folytatás az előző oldalról

GAZE annotáció ^a	Annotációs pont	Fehérje találat ^b	Vitis cDNS ^c	Nem Vitis EST ^d	Vitis EST ^e	Funkció ^f
GSVIVG00025895001	0,7811			12	4	
GSVIVG00025893001	4,2216			9	1	
GSVIVG00025892001	17,7896				5	
GSVIVG00025891001	11,6607				2	
GSVIVG00025890001	28,8451		1		4	
GSVIVG00025889001	9,0286				3	
GSVIVG00025887001	7,5437			14	2	

^a na – A GAZE annotáció nem talált gént, de határozott EST találatok vannak a szakaszra^b Fehérje találatok az UniProt és SwissProt adatbázisokban^c A Genoscope saját adatbázisa a teljes hosszúságú szőlő cDNS-ekről^d Nyilvánosan elérhető kétszikű EST-k^e Nyilvános *Vitis* EST-k^f A fehérje-találat prediktált funkciója, sokszor ugyancsak prediktálva

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném köszönetemet és hálámat kifejezni témavezetőmnek, Dr. Bisztray György Dénesnek, akitől rengeteget tanultam, és aki szakmai éleslátásával, emberi támogatásával, biztatásával végigkísért, irányított a dolgozat elkészítéséhez vezető úton, kétségeim között a helyes ösvényre irányított.

Köszönöm Dr. Facsar Gézának segítségét, hogy bevezetett a rózsák rejtelmeibe, értékes megjegyzésekkel segítette eredményeim értelmezését. Köszönöm Dr. Höhn Máriának folyamatos támogatását, biztatását, valamint Kerényi-Nagy Viktornak a rózsák rendszertanával kapcsolatos segítségét.

Köszönöm értékes segítségét ifj. Dr. Kozma Pálnak, akitől sokat tanultam a szőlőről, annak magvatlanságáról, a szőlőnemesítésről, és aki rendelkezésemre bocsátotta a vizsgált hibridcsaládok egy részét, valamint értékes megjegyzéseivel segítette dolgozatom elkészítését. Szintén köszönöm Dr. Sz. Nagy Lászlónak a szőlővel és annak magvatlanságával kapcsolatos megjegyzéseit, amelyekkel tágította látókörömet a szőlőnemesítés terén.

Köszönöm Nagy Istvánnak az AFLP technika alkalmazásában nyújtott segítségét. Dr. Burgyán József laboratóriumának munkatársaitól rengeteget tanultam a molekuláris genetika módszereiről, segítségüket ezúton köszönöm.

Hálával tartozom a BCE Genetika és Növénynemesítés Tanszék minden dolgozójának a tanszéken töltött évek során nyújtott támogatásukért, értékes tanácsaikért, külön köszönet illeti Bacskainé Papp Annát a magvatlanság markerezése során nyújtott segítségéért. A tanszéken töltött időre mindig meleg szívvel fogok emlékezni.

A BCE Szőlészeti Tanszék munkatársainak köszönöm a dolgozat elkészítése alatt tanúsított türelmüket, támogatásukat, segítségüket és mindazt a tudást, amellyel segítettek, hogy a szőlő növényt jobban megismerjem, megértsem.

Családom türelméért, támogatásáért szintén hálával tartozom: elviselték kései hazaérkezéseimet, éjszakába és hétvégébe nyúló kísérleteimet, csüggedésemben bátorítottak. Feleségem, Deák Éva olyan háttérrel biztosított, ami nélkül minden nehezebb lett volna.

